

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'ESSAIS DE CRIBLAGE D'INHIBITEURS DE  
L'HÉTÉRODIMÉRISATION DES FACTEURS INDUCTIBLES PAR L'HYPOXIE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

BILLEL DJERIR

AOÛT 2017

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»



## DÉDICACE

À mes parents Fatiha et AHCÈNE,  
en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à mes deux directeurs de recherche, Steve Bourgault et Marc Lussier, qui m'ont donné l'opportunité de réaliser une maîtrise et de collaborer à plusieurs projets en côtoyant des gens qui partagent la même passion. Plus particulièrement, merci Marc de m'avoir accordé ta confiance et ton soutien académique tout au long de mes projets. Merci Steve pour ton implication, ta rigueur et ton encadrement scientifique qui ont m'ont permis de grandir, tant sur le plan personnel que professionnel.

Je remercie l'organisme subventionnaire de ce projet, Mitacs, pour la bourse qui m'a été accordée, ainsi que notre partenaire de recherche IntelliSyn pour leur support et participation.

Je remercie également mes collègues de laboratoire, Trang, Ximena, Margaryta, Noé et Mathew qui avec le temps sont devenus des amis. Vous avez été une source de motivation et des exemples à suivre. Merci pour votre brin de folie et pour tous ses bons moments passés en votre compagnie.

Je ne peux terminer mes remerciements sans témoigner ma gratitude envers mes chers parents, Fatiha et AHCÈNE. Rien au monde ne vaut les efforts que vous avez fournis pour l'éducation et le bien-être de vos enfants. Ce travail est le fruit des sacrifices consentis. Un grand merci également à ma sœur, Djahida et mon frère, Oussama envers qui les mots ne suffisent pas pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je vous porte.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	VIII
LISTE DES TABLEAUX .....	X
LISTE DES ABREVIATIONS .....	XI
RÉSUMÉ .....	XIII
CHAPITRE I	
INTRODUCTION .....	1
1.1 Le cancer .....	1
1.1.1 Le cancer en quelques chiffres .....	1
1.1.2 Généralités .....	2
1.1.3 Oncogenèse.....	3
1.2 L'angiogenèse.....	7
1.2.1 L'angiogenèse physiologique .....	7
1.2.2 L'angiogenèse pathologique .....	8
1.2.3 L'angiogenèse associée au cancer .....	10
1.2.4 Les régulateurs de l'angiogenèse .....	13
1.3 L'hypoxie.....	15
1.3.1 L'homéostasie de l'oxygène .....	15
1.3.2 Facteurs de stress tissulaire .....	15
1.3.3 La réponse adaptative face au stress hypoxique.....	16
1.4 Les facteurs inductibles par l'hypoxie.....	18
1.4.1 Mécanisme et régulation.....	18
1.4.2 Structure des protéines HIFs .....	21
1.4.3 HIF-2 $\alpha$ , cible thérapeutique pour le développement d'inhibiteurs.....	23

1.5	Développement d'inhibiteurs d'interaction protéine-protéine.....	27
1.5.1	Interaction protéine-protéine .....	27
1.5.2	Développement d'inhibiteurs d'IPPs.....	28
1.5.3	Inhibiteurs des HIFs .....	29
1.6	Problématique et hypothèse de recherche.....	31
1.6.1	Objectifs de recherche .....	32
CHAPITRE II		
	MATÉRIEL ET MÉTHODE .....	34
2.1	Design et choix du vecteur.....	34
2.2	Expression et production protéique.....	35
2.2.1	Transformation bactérienne par choc thermique.....	35
2.2.2	Amplification et extraction des plasmides .....	36
2.2.3	Production des protéines recombinantes .....	36
2.3	Purification protéique.....	37
2.3.1	Lyse bactérienne.....	37
2.3.2	Chromatographie d'affinité et d'exclusion stérique .....	37
2.3.3	Clivage de l'étiquette.....	38
2.4	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) .....	38
2.5	Immunobuvardage de type Western .....	39
2.6	Spectroscopie par dichroïsme circulaire .....	39
2.7	Résonance des plasmons de surface.....	40
2.8	Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay (AlphaScreen™) .....	41
CHAPITRE III		
	RÉSULTATS .....	42
3.1	Transfection d' <i>E. coli</i> (DE3) avec pGEX-4T1.....	42
3.2	Production des protéines recombinantes.....	45
3.2.1	Purification des protéines recombinantes.....	45
3.2.2	Clivage et purification des protéines sans étiquettes.....	46
3.3	Analyse de la stabilité structurale des protéines purifiées .....	49



3.4	Analyse de l'hétérodimérisation de HIF-2 $\alpha$ /ARNT par la résonance des plasmons de surface .....	51
3.5	Analyse de l'hétérodimérisation de HIF-2 $\alpha$ /ARNT par AlphaScreen™. 55	
3.6	Essais de criblage d'inhibiteurs de HIF-2 $\alpha$ /ARNT par AlphaScreen™ ..	58
CHAPITRE IV		
DISCUSSION .....		61
CHAPITRE V		
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....		69
ANNEXE A.....		71
ANNEXE B .....		72
ANNEXE C .....		73
ANNEXE D.....		74
ANNEXE E .....		75
ANNEXE F .....		77
BIBLIOGRAPHIE .....		78

## LISTE DES FIGURES

Figures	Page
1.1 Prédiction de l'évolution des causes de décès au cours des prochaines années.....	2
1.2 Phases de la prolifération cellulaire dans le processus d'oncogenèse .....	5
1.3 Caractéristiques acquises des cellules tumorales.....	6
1.4 Principales différences entre les vascularisations physiologiques, tumorales et inadéquates.....	9
1.5 Étapes cellulaires impliquées dans l'angiogenèse physiologique.....	12
1.6 Représentation des gènes régulés par les HIFs et leurs effets sur la progression tumorale.....	17
1.7 Mécanisme du facteur de transcription inductible par l'hypoxie .....	20
1.8 Représentation des domaines fonctionnels des protéines HIFs.....	22
1.9 Structures individuelles et hétérodimérique de ARNT et HIF-2 $\alpha$ .....	24
1.10 Représentation générale de l'architecture hétérodimérique de HIF-2 $\alpha$ et ARNT avec l'interface interactionnelle des domaines PAS-B.....	26
1.11 Représentation des cibles stratégiques désignées par les agents thérapeutiques inhibant l'activité de HIF-1 .....	30
2.1 Schéma des trois constructions plasmidiques .....	35
3.1 Analyse par SDS-PAGE de l'expression plasmidique des trois souches d'E. coli (DE3) transformées avec pGEX-4T-1 .....	44
3.2 Analyse par SDS-PAGE du processus de purification protéique des trois souches d'E. coli (DE3) transformées avec pGEX-4T-1.....	46
3.3 Analyse par SDS-PAGE de la purification protéique après clivage par la thrombine .....	48
3.4 Analyse par dichroïsme circulaire de la structure secondaire des protéines	

HIF-2 $\alpha$ , ARNT-Flag et ARNT non étiquetées .....	50
3.5 Schématisation de l'approche appliquée à la résonance des plasmons de surface pour l'étude interactionnelle de HIF-2 $\alpha$ /ARNT .....	52
3.6 Analyse par résonance des plasmons de surfaces de la cinétique d'hétérodimérisation des domaines PAS-B. ....	53
3.7 Schématisation de l'approche de l'AlphaScreen™ appliquée au modèle interactionnel des domaines PAS-B de HIF-2 $\alpha$ et ARNT.....	56
3.8 Essais AlphaScreen™ d'inhibition par deux molécules de références.....	59
3.9 Essais AlphaScreen™ d'inhibition par des molécules de seconde génération en développement .....	60
S.1 Cartographie du vecteur plasmidique pGEX-4T-1 ayant servi pour les 3 constructions utilisées.....	71
S.2 Les séquences en acides aminés des domaines PAS-B de HIF-2 $\alpha$ , ARNT, ainsi que les étiquettes de purification GST et FLAG .....	72
S.3 Graphique des chromatographies d'exclusion stérique des différentes protéines purifiées après clivage de l'étiquette GST. ....	73
S.4 Structure secondaire des domaines PAS-B de ARNT et HIF-2 $\alpha$ .....	74
S.5 Analyse par SPR de la cinétique d'hétérodimérisation des domaines PAS-B par immobilisation covalente de HIF-2 $\alpha$ . ....	75
S.6 Analyse par SPR de l'hétérodimérisation des domaines PAS-B en présence d'un inhibiteur de référence C-01 .....	76

## LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Page
1.1 Les régulateurs endogènes de l'angiogenèse .....	14
3.1 Proportion de structures secondaires des protéines purifiées par déconvolution des spectres de CD .....	50
3.2 Signal de l'hétérodimérisation de HIF-2 $\alpha$ /ARNT par AlphaScreen™ en fonction de la concentration protéique.....	67
S.1 Alpha Signal du contrôle positif effectué avec le tampon d'essai vs les Omnibeads (Contrôle).....	77
S.2 Rapport du signal brute d'AlphaScreen™ sur le signal de bruit de fond de l'hétérodimérisation des domaines PAS-B de HIF-2 $\alpha$ /ARNT .....	77



## LISTE DES ABREVIATIONS

ADM	Adrénomédulline
AF	Aminoflavone
ANG	Angiopoïétine
Ang1	Angiopoïétine de type 1
Ang2	Angiopoïétine de type 2
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNT	Translocateur nucléaire d'arylhydrocarbène
bHFFH	Facteur de croissance de fibroblaste basique
bHLH-PAS	Basique hélice-boucle-hélice-per-ARNT-Sim
c-Myc	Homologue cellulaire de l'oncogène du virus myélocytomateux
EPO	Erythropoïétine
E3	Ubiquitine ligase
FIH1	Facteur-1 inhibiteur de HIF
Glut1	Transporteur de glucose 1
Glut3	Transporteur de glucose 3
HIFs	Facteurs inductibles par l'hypoxie
HIF-2 $\alpha$	Facteur-2 $\alpha$ inductible par l'hypoxie
HK1	Hexokinase 1
HK2	Hexokinase 2
HRE	Élément de réponse à l'hypoxie
IPP	Interaction protéine-protéine
ID2	Inhibiteur de la protéine liant l'ADN
IGF-BP2	Protéine de liaison au facteur IGF2
IGF-BP3	Protéine de liaison au facteur IGF3

IGF2	Facteur de croissance analogue à l'insuline 2
IPAS	Protéine inhibitrice du domaine PAS
LDHA	Lactate déshydrogénase
LRP-1	Protéine liée au récepteur de LDL1
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MSC	Se-méthylsélénocystéine
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO Synthase
ODDD	Dégradation dépendante de l'oxygène
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAS-A, -B	Per-ARNT-Sim-A (-B)
PDGF	Facteur de croissance dérivé de plaquettes
PHD1, 2, 3	Enzyme prolylhydroxylase
PKM	Pyruvate kinase M
pVHL	Protéine suppresseur de tumeur Von Hippel Lindau
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SPR	Résonance de plasmon de surface
S1P1	Sphingosine-1 phosphate-1
TAD	Domaine de transactivation
TAF	Facteurs angiogéniques tumoraux
TGF- $\alpha$	Facteur de croissance transformant $\alpha$
TGF- $\beta$	Facteur de croissance transformant $\beta$
TIE-2	Récepteur à l'angiotensine
TNF $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale de type $\alpha$
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

## RÉSUMÉ

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont permis de mieux comprendre les mécanismes adaptatifs de survie qui permettent aux cellules cancéreuses de progresser dans un microenvironnement à faible tension d'oxygène. Particulièrement, au niveau du foyer hypoxique des tumeurs solides mal vascularisées, les facteurs de transcription inductibles par l'hypoxie (HIFs) jouent un rôle clé dans l'adaptation au stress hypoxique. À cet effet, sous faible tension d'oxygène, le facteur de transcription, HIF-2 $\alpha$  s'hétérodimérise avec le translocateur nucléaire d'arylhydrocarbène (ARNT) dans le noyau. Ce complexe hétérodimérique lie l'ADN pour réguler l'expression d'une centaine de gènes, dont plusieurs codent pour des protéines cruciales dans la survie et la prolifération des cellules. Bien que son activité soit régulée à la hausse dans la plupart des cancers, accélérant la progression tumorale, aucun médicament ciblant HIF-2 $\alpha$  n'est utilisé en clinique. Ainsi, les inhibiteurs de HIF-2 $\alpha$  représentent une classe d'agents anticancéreux affichant un grand potentiel thérapeutique. Dans ce contexte, notre étude vise à mettre en place des essais de criblage d'inhibiteurs de l'hétérodimérisation de HIF-2 $\alpha$  via son domaine PAS-B, afin de soutenir l'identification de nouveaux pharmacophores. Pour atteindre cet objectif, nous avons initialement exprimé les domaines PAS-B de HIF-2 $\alpha$  et de ARNT à l'aide d'un modèle *Escherichia coli*, suivi des étapes de purification par chromatographie d'affinité, d'exclusion stérique et un clivage sélectif des étiquettes. Ensuite, l'étude cinétique de l'hétérodimérisation HIF-2 $\alpha$ /ARNT a été réalisée au moyen de la résonance des plasmons de surface. Un criblage de molécules antagonistes de l'hétérodimérisation HIF-2 $\alpha$ /ARNT a été développé à l'aide de la technologie AlphaScreen™. Globalement, les essais biochimiques et biophysiques mis en place lors de cette étude soutiendront le développement d'une nouvelle génération d'inhibiteurs de l'activation de HIF-2 $\alpha$  et pourraient conduire à de nouveaux traitements contre le cancer.

## Mots clés

Hypoxie, Facteur-2 $\alpha$  inductible par l'hypoxie (HIF-2 $\alpha$ ), Translocateur nucléaire d'arylhydrocarbène (ARNT), Interaction protéine-protéine (IPP), Purification protéine, Résonance des plasmons de surface, AlphaScreen™.

## CHAPITRE I

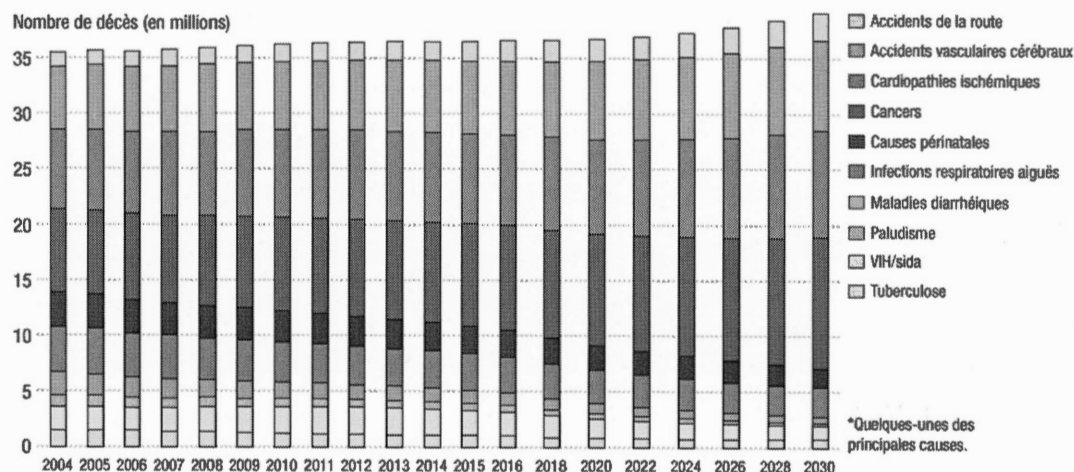
### INTRODUCTION

#### 1.1 Cancer

##### 1.1.1 Le cancer en quelques chiffres

Les spécialistes en perspectives démographiques sont unanimes : la population mondiale ne cesse de croître et la tendance s'accroît. Parallèlement à cet accroissement démographique, les pathologies liées aux cancers connaissent également une recrudescence avérée et ce, malgré tous les efforts consentis dans le perfectionnement des moyens de diagnostic. Ainsi, depuis de nombreuses années, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) attribue aux cancers la plus importante cause de morbidité et de mortalité dans le monde. Uniquement au Canada, on estime qu'il y a eu 202 400 nouveaux cas de cancers et 78 800 décès causés par cette maladie en 2016, selon le Comité consultatif de la Société canadienne du cancer (OMS 2009). Ce n'est pas tout, le nombre de cas annuel de cancers devrait tripler d'ici 2030 par rapport au début de ce siècle, passant à 21,6 millions (figure 1.1) (OMS 2009). Les chiffres alarmants manifestent l'enjeu vital de cette maladie dévastatrice en tant que problème de santé publique. C'est pour cette raison que la recherche est déployée de façon importante afin de contrecarrer cette maladie qui fait rage dans les quatre coins du globe et ce, en trouvant de nouvelles voies thérapeutiques.





**Figure 1.1 Prédiction de l'évolution des causes de décès au cours des prochaines années.** Représentation quantitative et prédictive de l'évolution des causes de mortalité selon le rapport de l'OMS à l'échelle mondiale.

Tirée de (OMS 2009)

### 1.1.2 Généralités

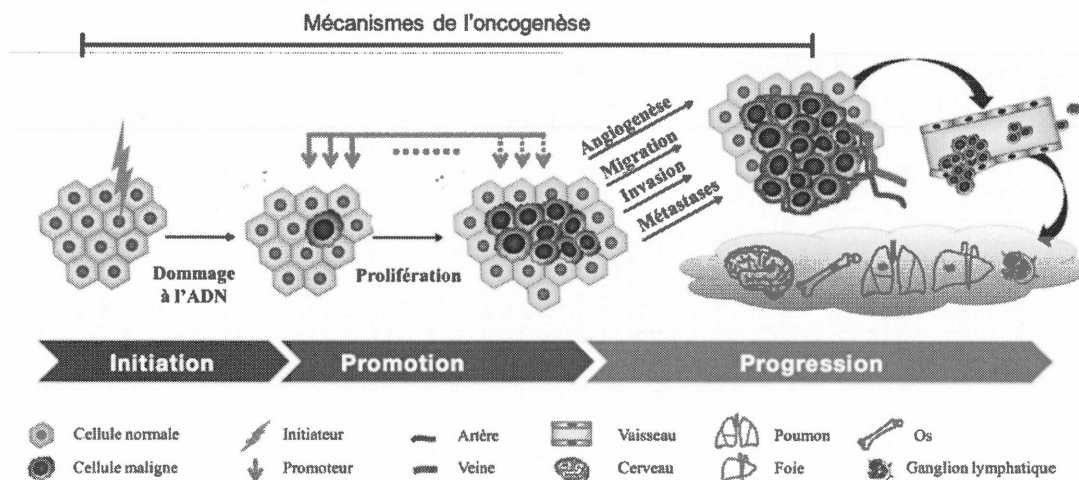
Le cancer est un terme général désignant un ensemble de maladies caractérisées par un dysfonctionnement au niveau des cellules, regroupées en tissus et formant un organe. En soit, décéder du cancer est en quelque sorte dénudé de sens, puisque ce sont les conséquences de sa progression qui mènent aux effets létaux, tel que l'insuffisance respiratoire, la dénutrition et l'accumulation de toxines normalement évacuées (Gabriel 2007, Delehedde 2013). Par conséquent, le traitement tardif du cancer accélère le dysfonctionnement des fonctions vitales, ce qui implique de très mauvais pronostiques.

Chez un individu sain, le patrimoine génétique soumet les cellules à des signaux hautement régulés leur permettant une croissance contrôlée et une fonction précise, jusqu'à ce que celles-ci meurent de façon contrôlée (Gupta, Kim et al. 2010). Dans les cas pathologiques, il advient que ces signaux cellulaires soient dérégulés par différentes prédispositions, provoquant chez les cellules une croissance affranchie de toutes régulations leur permettant de proliférer en échappant aux mécanismes de mort cellulaire (Béliveau and Gingras 2007). Cette prolifération cellulaire anormale, au sein d'un tissu, conduit généralement à la formation d'une masse ou de ce qu'on appelle communément une tumeur. Les tumeurs cancéreuses dites malignes ont un caractère invasif de par leur capacité de diffusion à travers la circulation sanguine et le système lymphatique donnant naissance à des métastases ailleurs dans l'organisme (Folkman 1995, Carmeliet and Jain 2000). Les phénotypes invasifs et métastatiques des tumeurs malignes les rendent aptes à former des foyers tumoraux secondaires dans un ou plusieurs organes via la circulation sanguine (Claesson-Welsh 2012). Pour cette raison, la détection et le traitement des tumeurs malignes sont très importants. À l'opposé, les tumeurs bénignes sont habituellement sans gravité puisqu'elles restent solidement ancrées au niveau du tissu dans lequel elles apparaissent et se développent très lentement (Claesson-Welsh 2012). Lorsqu'elles apparaissent dans les organes, si elles n'exercent pas une haute pression sur les tissus voisins et qu'elles ne possèdent pas une taille excessive, une chirurgie peut s'opérer pour le retrait de la masse sans possibilité de réapparition. De façon globale, les tumeurs bénignes sont habituellement non cancéreuses et ne sont pas associées aux décès (Gloria, Li et al. 2010).

### 1.1.3 Oncogenèse

À priori, toute cellule saine est susceptible de devenir cancéreuse au courant de son évolution au sein de l'organisme. En effet, dans le processus évolutif d'une cellule, celle-ci peut être confrontée à des phénomènes impliquant sa déviation vers un stade

cancéreux (Béliveau and Gingras 2007). Cela se nomme l'oncogenèse ou encore la cancérogenèse. Suite aux études réalisées, il y a maintenant plus d'une soixantaine d'années, plusieurs modèles ont été établis pour définir cette transition des cellules saines vers l'aspect tumoral. Cette caractérisation se présente en trois phases principales d'une durée variable, soit l'initiation, la promotion et la progression (figure 1.2). L'initiation est irréversible et résulte d'une mutation génétique non silencieuse apparaissant sous l'action d'un facteur de risque endogène ou exogène. Ensuite, la cellule entre en phase de promotion, une étape durant laquelle la cellule échappe aux mécanismes de réparation de l'ADN et augmente la synthèse protéique. Elle devient alors instable et accumule des mutations lui permettant de proliférer, en n'étant plus sensible aux signaux d'inhibition de croissance. De plus, durant cette phase, il y a une surproduction de prostaglandines, d'oncoprotéines et de facteurs de croissance qui soutiennent le dérèglement de la cellule (Hanahan and Weinberg 2011). La dernière phase est la progression où les cellules prolifératives prennent de l'expansion et s'organiser de façon à former un néoplasme avec une activation des oncogènes et une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs. Suite à ces stades d'évolution, l'acquisition phénotypique des cellules tumorales durant la cancérogenèse implique des caractères très bien définis (Hanahan and Weinberg 2011).



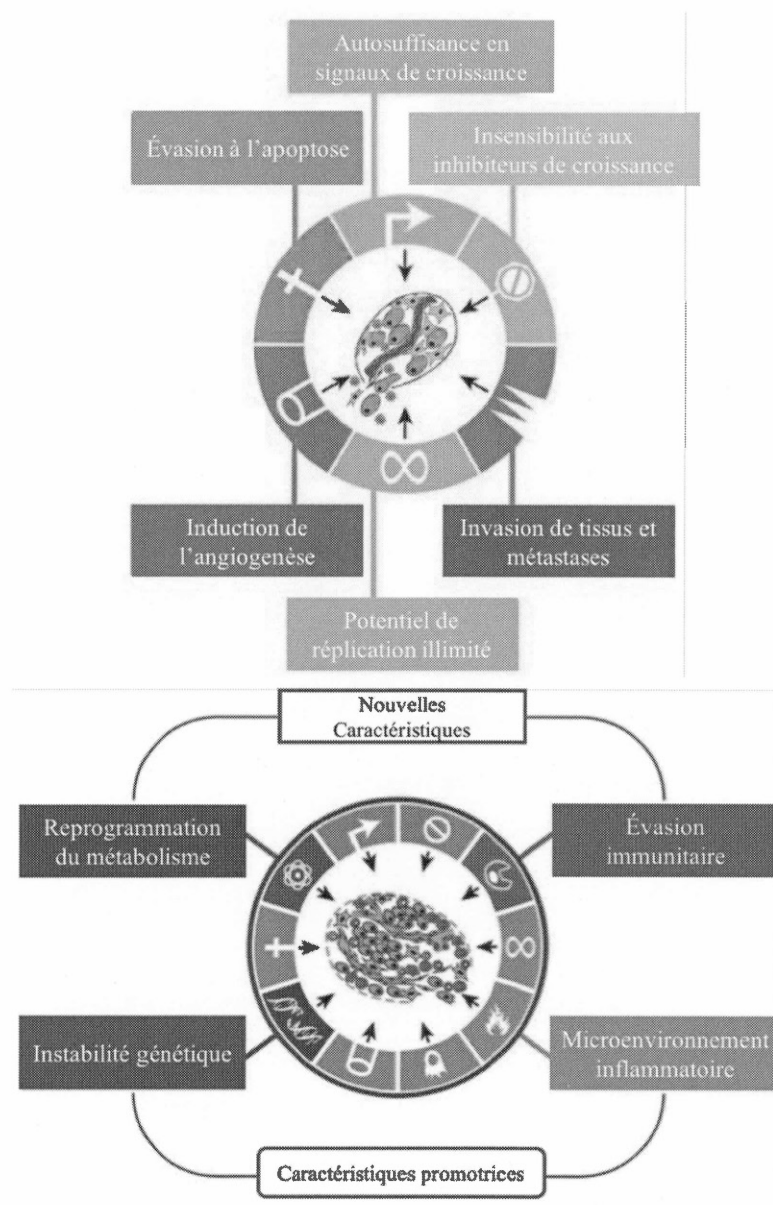
**Figure 1.2 Phases de la prolifération cellulaire dans le processus d'oncogenèse.**

La cancérogenèse se déroule sur une période de temps variable, décrite en trois étapes principales. D'abord, des facteurs variables (chimique, génique, environnement et plus encore) déclenchent des modifications chez une cellule saine pour initier la cancérogenèse. À la phase de promotion, la cellule mutante initiée acquiert un avantage prolifératif en raison des lésions au niveau de l'ADN. Ces lésions mènent à l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, sous l'action d'agents promoteurs. Finalement, la phase de progression se présente lorsque le cancer s'établit et devient cliniquement détectable via la formation d'un néoplasme.

Adaptée de (Liu, Yin et al. 2015)

Parmi les caractères phénotypiques présentés à la figure 1.3, on retrouve l'induction de l'angiogenèse qui, à ce jour, fait l'objet de plusieurs recherches. L'induction de l'angiogenèse au cours de la cancérogenèse est connue grâce aux travaux majeurs de Folkman en 1971, constituant la base des études pour la mise en place de meilleures approches thérapeutiques contre le cancer (Folkman 1971).





**Figure 1.3 Caractéristiques acquises des cellules tumorales.** Les six modifications essentielles au niveau de la physiologie cellulaire conditionnant une croissance cellulaire maligne établie avant le début de ce siècle. La recherche dans ce domaine ayant progressé durant la dernière décennie, d'autres caractéristiques biologiques ont pu être décelées. Actuellement, un ensemble de dix caractéristiques sert de base dans le cadre de la recherche pharmaceutique pour l'établissement de nouvelles thérapies.

Adaptée de (Hanahan and Weinberg 2000, Hanahan and Weinberg 2011)

## 1.2 L'angiogenèse

### 1.2.1 L'angiogenèse physiologique

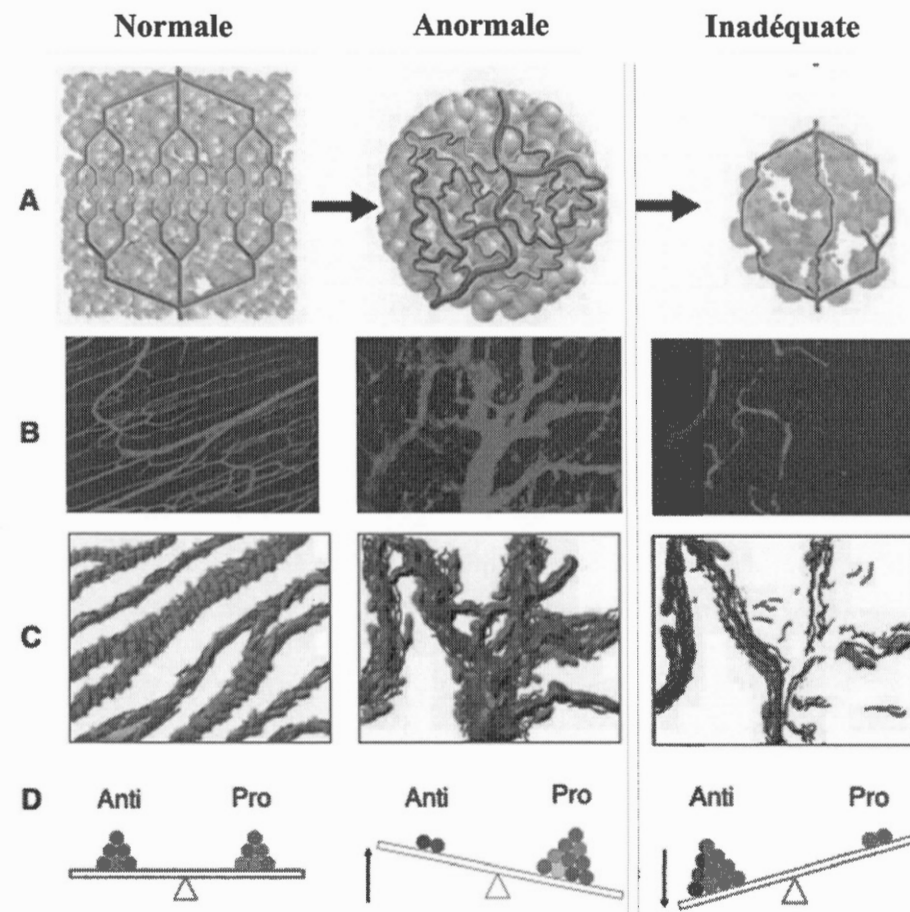
Pour remplir l'ensemble des fonctions essentielles pour sa survie, le corps humain est doté d'un nombre important de cellules, d'une très grande diversité et spécificité. Les cellules d'un même type, vont s'organiser en tissus, et ces tissus vont former à leur tour un organe tel que le foie, le cœur, les os etc. Ces cellules, nécessitent un apport constant en oxygène et en nutriments variés qui sont acheminés via le système vasculaire sanguin. Pour cette raison, on estime de façon superficielle qu'une population de cellules au sein d'un tissu doit se retrouver dans un périmètre de 100 à 200  $\mu\text{m}$  d'un vaisseau capillaire pour survivre et remplir ses fonctions physiologiques (Eales, Hollinshead et al. 2016). Au cours du développement, cette proximité est assurée conjointement par une croissance des vaisseaux sanguins et par le parenchyme. À cet égard, l'angiogenèse est le processus physiologique par lequel il y a une formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (Folkman and Shing 1992). L'angiogenèse est d'abord et avant tout un processus physiologique normal et essentiel, tel qu'observé durant le développement embryonnaire et la cicatrisation postopératoire (Risau 1997, Lamalice, Le Boeuf et al. 2007). Pourtant, comme mentionné préalablement, l'angiogenèse peut rapidement devenir pathologique et cette frontière fragile, entre la forme physiologique et pathologique, repose sur le contrôle très strict de régulateurs endogènes (figure 1.4) (Carmeliet and Jain 2011).

### 1.2.2 L'angiogenèse pathologique

Le processus d'angiogenèse peut, dans certains cas, ne plus répondre de manière adéquate en étant déstabilisé par différents signaux cellulaires et évoluer vers un

stade pathologique. Par exemple, plusieurs maladies, dont la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis et la dégénérescence maculaire mènent suite à leur progression, à une induction excessive d'angiogenèse qui cause des dommages irréparables. Cette vascularisation anormale peut engendrer des maladies inflammatoires comme l'hypertension pulmonaire ou encore le cancer (Walsh and Pearson 2001). Inversement, quand l'angiogenèse n'arrive pas à combler un besoin, c'est-à-dire lorsqu'elle est insuffisante, elle entraîne une ischémie (Carmeliet and Jain 2011).

La dérive pathologique de l'angiogenèse repose directement sur un déséquilibre entre les facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques (figure 1.4). En outre, l'angiogenèse physiologique se distingue de la forme pathologique de par son organisation structurelle (figure 1.4). En effet, lors de l'angiogenèse physiologique, les vaisseaux sont arrangés de façon échelonnée : artères, capillaires et veines. En revanche, la néovasculature formée lors de l'angiogenèse pathologique est structurellement et fonctionnellement anormale avec des branchements irréguliers, dilatés et hyperperméables aux petites molécules, fluides et protéines plasmatiques (Claesson-Welsh 2012, Dvorak 2015).



**Figure 1.4 Principales différences entre les vascularisations physiologiques, tumorales et inadéquates.** (A) Structures schématiques de vascularisation normale vs. anormale. (B) Dynamiques des vascularisations normales et anormales. (C) Schéma représentant les niveaux de la membrane basale (bleu) et des péricytes (vert). (D) Balance de facteurs pro- et anti-angiogéniques. Anti : molécules anti-angiogéniques; Pro : molécules pro-angiogéniques.

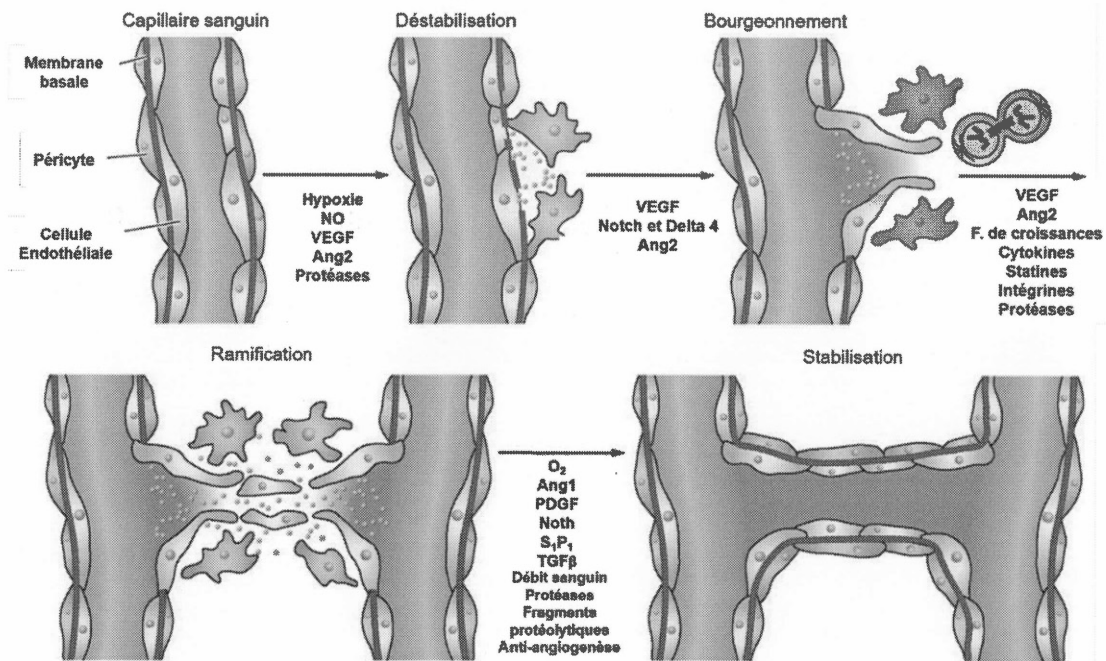
Adaptée de (Jain 2005)

### 1.2.3 L'angiogenèse associée au cancer

Sans équivoque, la croissance rapide des tumeurs solides résulte majoritairement du processus d'angiogenèse stimulé par les signaux activateurs non contrôlés des cellules cancéreuses (Folkman 1971). À ce propos, en 1982, l'équipe du Dr. Muthukkaruppan a comparé le comportement de cellules cancéreuses infusées dans différentes parties d'un même organe, soit une région de l'iris parfaitement bien vascularisée par la circulation sanguine et une région de la chambre antérieure non vascularisée. Ils ont noté que les cellules sans aucune circulation arrêtaient de croître lorsque l'amas cellulaire atteignait 1 – 2 mm de diamètre (Muthukkaruppan, Kubai et al. 1982). À l'inverse, les cellules cancéreuses bénéficiant d'une circulation sanguine avaient poursuivi leur croissance au-delà de 2 mm puisqu'elles étaient dans une zone où l'angiogenèse pouvait avoir lieu avec une vascularisation préexistante (Muthukkaruppan, Kubai et al. 1982). Ceci explique pourquoi on retrouve parfois une zone nécrosée au sein d'un foyer tumoral plus ou moins bien vascularisé (Holmgren, O'Reilly et al. 1995, Parangi, O'Reilly et al. 1996). Dès lors, l'angiogenèse devient un élément indispensable dans la progression tumorale et ceci explique également l'apparition des thérapies anti-cancers ciblant l'angiogenèse via les inhibiteurs de facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et leur récepteur (VEGFR), développées durant la dernière décennie. Certes, ces thérapies prometteuses ciblant l'angiogenèse, n'ont à ce jour jamais été concluantes. Cependant, il n'en demeure pas moins que les postulats relatifs aux thérapies angiogéniques des tumeurs proposées, il y a de cela 50 ans par Judah Folkman, font toujours l'objet d'études dans notre lutte contre le cancer.

L'angiogenèse tumorale ou encore la néovascularisation néoplasique, est principalement constituée de 3 étapes (figure 1.5) (Clapp, Thebault et al. 2009). Premièrement, les vaisseaux sanguins préexistants se dilatent et les cellules péricytes se détachent, provoquant ainsi la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire (MEC). Deuxièmement, cette dégradation est suivie par une migration dans l'espace périvasculaire des cellules endothéliales vers les stimuli des cellules avoisinant la zone hypoxique. Puis, guidées par les péricytes, les cellules endothéliales prolifèrent et récupèrent leur stabilité en formant une pousse qui aboutira à un vaisseau nouvellement créé. Troisièmement, les facteurs pro-angiogéniques maintiennent leur influence favorable à la néovascularisation et prennent le dessus sur les facteurs inhibiteurs. C'est ce qu'on appelle le « switch angiogénique », qui constitue un phénomène actif renfermant une production et une sécrétion de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales, lorsque celles-ci sont conditionnées pour s'affranchir d'un état de stress hypoxique. Ce «switch angiogénique», par lequel les événements décrits précédemment prennent place a été démontré chez des modèles de souris transgéniques RIP-Tag, qui développent des insulinomes spontanés sans métastase (Shchors, Shchors et al. 2006). Essentiellement, ce modèle a permis l'observation de deux phénomènes cellulaires. L'isolation de cellules tumorales provenant des premiers stades de progression tumorale n'a montré aucune réponse angiogénique lorsqu'elles ont été mises en culture avec des cellules endothéliales *in vitro*. Toutefois, l'isolation de cellules tumorales à partir d'un stade subséquent a déclenché une forte réponse angiogénique via les cellules endothéliales. Ce « switch angiogénique » est donc associé à une réponse contre le stress hypoxique, jouant un rôle clé dans la biologie des tumeurs solides.





**Figure 1.5 Étapes cellulaires impliquées dans l'angiogenèse physiologique.** L'hypoxie induit la production d'oxyde nitrique (NO), l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et angiopoïétine-1 et -2 (Ang 1 et Ang 2), qui interagissent avec les protéases de la matrice extracellulaire (MEC) pour augmenter la perméabilité du capillaire. La déstabilisation permet alors aux cellules endothéliales de migrer et de proliférer pour former des tubules, soutenus par le VEGF, les angiopoïétines, les molécules de guidage, les facteurs de croissance, les cytokines et la dégradation de l'MEC. La maturation du vaisseau nouvellement formé s'accompagne d'une augmentation de l'expression de facteurs anti-angiogéniques et d'une libération de plusieurs molécules suivant la protéolyse. PDGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes; S<sub>1</sub>P<sub>1</sub>, sphingosine-1-phosphate-1; TGFβ, facteur de croissance transformant-β.  
Adaptée de (Clapp, Thebault et al. 2009)



#### 1.2.4 Les régulateurs de l'angiogenèse

La régulation angiogénique est modulée par plus d'une douzaine de protéines activatrices différentes, dont le VEGF, le facteur de croissance de fibroblaste basique (bFGF), l'angiogénine (ANG), le facteur de croissance transformant alpha et beta (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) et plusieurs autres présentées dans le tableau 1.1. La grande famille des protéines VEGF, ainsi que leurs récepteurs (VEGFR) est particulièrement impliquée dans l'angiogenèse, tant physiologique que pathologique (Claesson-Welsh 2012). La liaison de VEGF à son récepteur active des protéines relais qui transmettent un signal vers le noyau. Ensuite, ce signal nucléaire soutient l'expression d'un groupe de gènes codant pour des éléments essentiels à la production de nouvelles cellules endothéliales. Les cellules endothéliales activées par le VEGF produisent des métalloprotéinases de matrice (MMPs). Les MMPs sont des endopeptidases ayant la capacité de détruire les composantes protéiques de la MEC, permettant la migration de ces cellules (Sternlicht and Werb 2001). La migration cellulaire vers les tissus environnants est appuyée par une division cellulaire accentuée. De cette manière, un tube creux évolue progressivement en un réseau mature de vaisseaux sanguins avec la sécrétion de facteurs d'adhésions, tel que l'intégrine  $\alpha$  ou  $\beta$  (Mizejewski 1999, Nelson, Fingleton et al. 2000). Finalement, la maturation de ces vaisseaux nouvellement formés est assurée entre autre par l'angiotensine -1, -2 et leur récepteur TIE-2 (Suri, Jones et al. 1996, Maisonpierre, Suri et al. 1997, Tournaire, Simon et al. 2004).

**Tableau 1.1 Les régulateurs endogènes de l'angiogenèse.**

Adapté de (Nishida, Yano et al. 2006)

<b>Activateurs</b>	<b>Inhibiteurs</b>
<u>Facteurs de croissance</u>	
Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire	
Facteur de croissance de fibroblaste	
Angiogénine	
Angiotensine	
Facteur de croissance transformant	
Facteur de nécrose tumorale- $\alpha$	
Facteur de croissance endothélial	
Facteur de croissance des hépatocytes	
Facteur de croissance épidermique	
Facteur de croissance placentaire	
Facteur stimulant les colonies de granulocytes	
<u>Cytokines</u>	
Interleukine-1, -6, -8	Interleukine-10, -12
<u>Protéases et inhibiteurs de protéases</u>	
Cathepsine	Inhibiteur tissulaire
Gélatinase-A, -B	Métalloprotéase
Stromélysine	Plasminogène
Activateur du plasminogène de type urokinase	Activateur-inhibiteur-1
<u>Éléments ioniques</u>	
Cuivre	Zinc
<u>Oncogènes</u>	
c-myc ras	p53 Rb
c-src-v-raf	
c-jun	
<u>Modulateurs endogènes</u>	
Alpha 5 Beta 3 intégrine	Angiopoïétine-2
Angiopoïétine-1	
Endothéline	Angiotensine
Érythropoïétine	
Hypoxie	Cavéoline-1,-2
Oxyde nitrique synthétase	Endostatine
Facteur d'activation plaquettaire	Interféron-alpha
Facteur plaquettaire 4	Iso flavonoïdes
Prostaglandine E	

### 1.3 L'hypoxie

#### 1.3.1 L'homéostasie de l'oxygène

Le maintien homéostatique de l'oxygène au sein de l'organisme est un caractère essentiel pour la survie. L'évolution, sur le plan physiologique, a permis le maintien d'une oxygénation optimale des cellules. Les organismes complexes, tel que nous les humains, ont développé une infrastructure physiologique complexe, comme par exemple le cœur, les poumons, les vaisseaux sanguins et les globules rouges pour permettre l'acheminement de l'oxygène, des nutriments et l'élimination des déchets métaboliques de façon structurée et coordonnée. Ceci est en quelque sorte la base élémentaire de ce développement complexe et de la régulation de ces systèmes physiologiques pour maintenir l'homéostasie de l'oxygène.

#### 1.3.2 Facteur de stress tissulaire

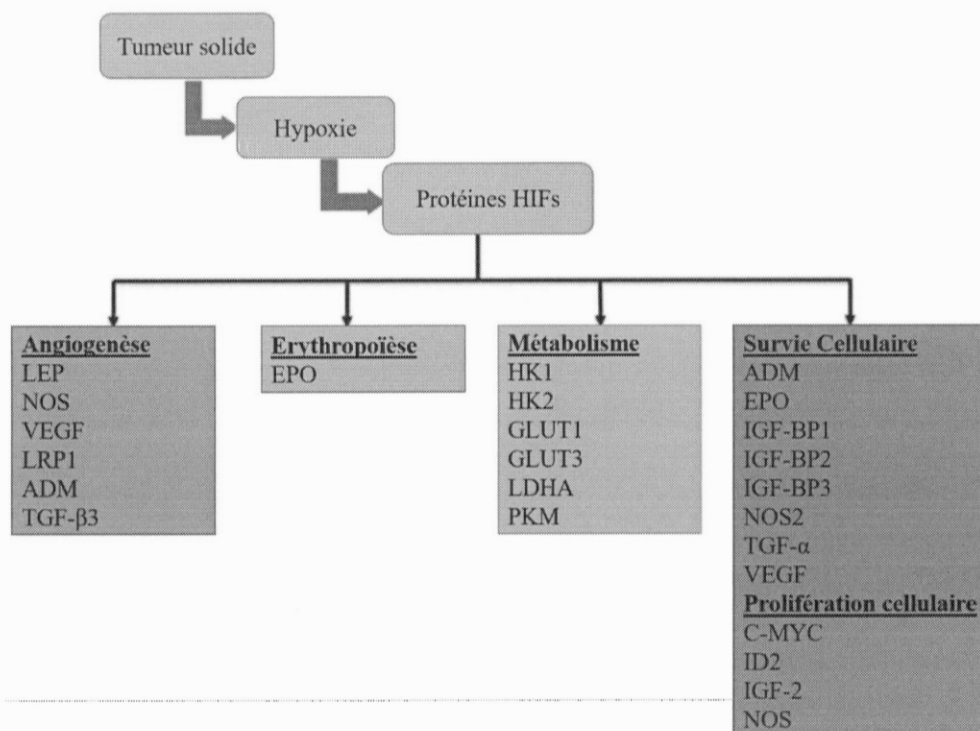
L'hypoxie se définit par une tension faible, ou insuffisante d'oxygène, causée par une diminution de la saturation en oxygène dans le sang artériel. Concrètement, l'air environnant a une composante en oxygène de 21% (160 mmHg), mais au niveau de la circulation sanguine, elle chute à 6% (38 mmHg) (Mohyeldin, Garzon-Muvdi et al. 2010, Carreau, El Hafny-Rahbi et al. 2011). Cette tension en oxygène dans les vaisseaux sanguins est suffisante pour un apport normal afin de supporter l'activité fonctionnelle des cellules, en particulier la respiration oxydative. Effectivement, pour la quasi-totalité des organismes vivants (excepté les végétaux), l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) est l'oxydant le plus fréquent dans les systèmes biologiques, permettant aux cellules de produire de l'énergie métabolique pour le développement et leur activité. Cependant, dans le cas du développement d'une tumeur solide, la prolifération cellulaire incontrôlée va générer un centre hypoxique, un des éléments perturbateurs entraînant la progression tumorale (Folkman 2004). Ce centre

hypoxique est étroitement lié à une vascularisation insuffisante, voire même absente au sein de la masse néoplasique. Par conséquent, la tension en oxygène dans ce microenvironnement tumoral n'est plus qu'à environ 1% (Grimes, Fletcher et al. 2014). Dans ces conditions intenses de stress, la cellule a mis au point des mécanismes pour s'accommoder de cet environnement afin d'éviter la nécrose cellulaire et poursuivre sa prolifération jusqu'à une phase avancée de la progression et pour atteindre le caractère invasif et métastatique (Folkman 2006).

### 1.3.3 Réponse adaptative face au stress hypoxique

Les cellules, tant normales que cancéreuses, sont dépendantes de l'oxygène afin d'exécuter leur métabolisme sous conditions aérobiques pour leur croissance et leur production d'énergie. Dans le cas du cancer, les maladies cardiaques ou encore les troubles pulmonaires obstructifs chroniques, l'équilibre cellulaire de l'oxygène est bouleversé, provoquant ainsi un stress hypoxique. Comme nous l'avons énoncé précédemment, l'hypoxie est corrélée à l'évolution d'une tumeur solide. Les cellules cancéreuses prolifèrent rapidement et forment des masses tumorales obstruant et compressant des vaisseaux sanguins adjacents. Les cellules tumorales dans cette zone hypoxique vont mettre en fonction un mécanisme adaptatif en activant plusieurs voies de survie (Risau 1997). En effet, la réponse adaptative à une tension faible d'oxygène découle de l'activation de facteurs inductibles par l'hypoxie (HIFs) présents chez les organismes multicellulaires. Ces facteurs de transcription affichent des rôles importants dans le maintien de l'homéostasie de l'oxygène cellulaire (figure 1.6). Brièvement, ce système adaptatif repose sur la formation d'un complexe hétérodimérique de deux sous-unités protéiques  $\alpha/\beta$  des HIFs, liant des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) sur l'ADN. Ceci permet aux cellules de déclencher l'expression de gènes liés à des fonctions contrecarrant les effets délétères de l'hypoxie. Par conséquent, ce sont ces facteurs inductibles par

l'hypoxie qui sont les principaux éléments de réponse de l'hypoxie tissulaire (Maxwell, Dachs et al. 1997, Hirota and Semenza 2006).



**Figure 1.6 Représentation des gènes régulés par les HIFs et leurs effets sur la progression tumorale.** LEP, leptine; NOS, oxyde nitrique synthétase; VEGF, facteur de croissance endothélial vasculaire; LRP1, protéine liée aux récepteurs de LDL-1; ADM, adrénomédulline; TGF-β3, facteur de croissance transformant-β3; EPO, érythropoïétine; HK1, hexokinase 1; HK2, l'hexokinase 2; GLUT1, transporteur de glucose 1; GLUT3, transporteur de glucose 3; LDHA, lactate déshydrogénase; PKM, pyruvate kinase M; IGF2, facteur de croissance analogue à l'insuline 2; L'IGF-BP2, la protéine de liaison au facteur IGF 2; L'IGF-BP3, la protéine 3 de liaison au facteur IGF; TGF-α, facteur de croissance transformant α; C-MYC, homologue cellulaire de l'oncogène du virus myélocytomateux; ID2, inhibiteur de la protéine liant l'ADN.

Adaptée de (Masoud and Li 2015)

## 1.4 Les facteurs inductibles par l'hypoxie

Les tumeurs mal oxygénées sont, pour la plupart du temps, bien plus agressives que les tumeurs oxygénées (tumeur non solides). L'adaptation cellulaire à un stress hypoxique est donc un processus inévitable pour la progression de ces tumeurs. Ce mécanisme adaptatif est sous la gouvernance d'un complexe dimérique de facteurs inductibles par l'hypoxie, très bien coordonné avec d'autres acteurs protéiques. Il y a donc une régulation étroite de la cellule qui est perpétuellement à l'affut du moindre changement des niveaux d'oxygène tissulaire.

La découverte de HIF remonte au début des années 90 avec les travaux menés par Semenza et ses collaborateurs sur le gène de l'érythropoïétine (EPO). Les études ont mis en lumière des séquences d'ADN (5'-RCGTG-3') dans la région flanquée en 3' du gène de l'EPO (Wiesener, Turley et al. 1998). Ces séquences d'ADN se sont révélées être essentielles pour l'activation transcriptionnelle du gène de l'EPO en réponse à l'hypoxie, d'où provient l'appellation « élément de réponse à l'hypoxie ». D'autres études ont démontré que l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes régulateurs est initiée par la liaison d'une protéine spécifique qui est induite par l'hypoxie. Plus tard, cette protéine a été identifiée comme HIF (Wiesener, Turley et al. 1998).

### 1.4.1 Mécanisme et régulation

Dans un premier temps, lorsque les cellules sont en conditions physiologiques normales, avec une teneur adéquate en oxygène (160 mmHg), les protéines HIFs homologues de la sous-unité  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , -2 $\alpha$  et -3 $\alpha$ ) sont rapidement dégradées par la machinerie cellulaire (figure 1.7). À cet effet, les cellules expriment trois enzymes prolylhydroxylases (PHD1, 2, 3) qui vont catalyser le transfert de

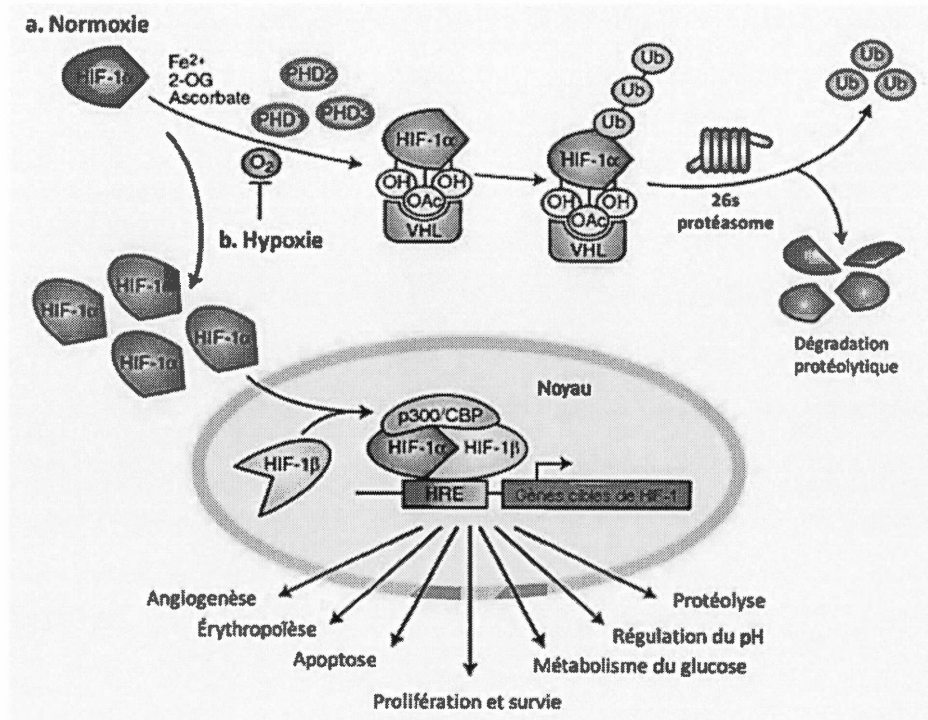


groupements hydroxyles sur deux résidus prolines conservés (Pro-402, Pro-564) et sur une asparagine en position 803 de la région de dégradation dépendante de l'oxygène (ODDD) des HIFs- $\alpha$  (Semenza 2001, Ke and Costa 2006). Des acétylations peuvent également avoir lieu dans cette même région. Ces enzymes PHDs sont considérées comme des capteurs physiologiques de l'oxygène moléculaire dans la cellule, avec une valeur de  $K_M$  légèrement supérieure à la concentration d' $O_2$  dissoute dans l'air ( $\sim 200 \mu M$ ) et c'est pour cette raison que leur activité enzymatique est dépendante de l'apport en oxygène (Meneses and Wielockx 2016). Ces modifications post-traductionnelles permettent la reconnaissance de HIF- $\alpha$  par une E3 ubiquitine ligase, la protéine suppresseur de tumeur von Hippel Lindau (pVHL). Cette dernière va ubiquitiner HIF- $\alpha$  pour ultimement la diriger vers le protéasome 26S par lequel il sera dégradé (Semenza 2001). Il faut également souligner que sous ces conditions normoxiques, les niveaux protéiques des HIFs- $\alpha$  sont maintenus à de faibles concentrations par le facteur inhibiteur de HIF (FIH1), évitant de cette façon une production excessive et une dépense d'énergie inutile pour la cellule saine (Lofstedt, Fredlund et al. 2007). En somme, les sous-unités  $\alpha$  des HIFs subissent des modifications post-traductionnelles en condition basale pour détourner leur translocation au noyau et l'hétérodimérisation avec la sous-unité  $\beta$ , empêchant la surexpression des gènes cibles pro-angiogéniques.

Dans un environnement cellulaire hypoxique, l'activité des enzymes PHDs et FIH1 est diminuée, ce qui stabilise les sous-unités  $\alpha$  des HIFs. Le niveau protéique dans le cytosol est à la hausse et les HIFs sont acheminés dans le noyau. Une fois dans le noyau, la sous-unité  $\alpha$  se lie au coactivateur nucléaire p300 et à la protéine de liaison de l'élément de réponse AMPc (p300/CREB). Cette interaction initie la réponse transcriptionnelle par l'activation des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) pour induire l'expression de gènes cibles. Le complexe dimérique HIF- $\alpha/\beta$  lie précisément une séquence consensus (A/G)CGTG des promoteurs de gènes liés à HRE. De cette manière, la cellule met en branle une activité de survie sur de



nombreux plans, que cela concerne le métabolisme du glucose via les transporteurs de glucose (GLUT), l'érythropoïèse via EPO et surtout la migration des cellules endothéliales pour l'angiogenèse via VEGF (figure 1.7).

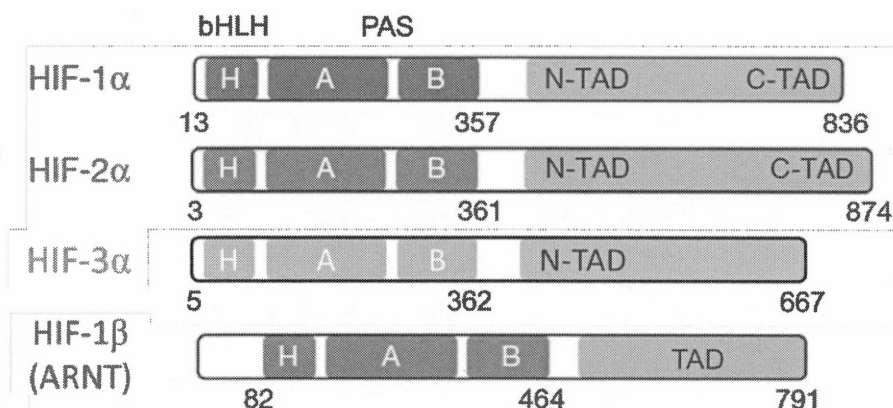


**Figure 1.7 Mécanisme du facteur de transcription inducible par l'hypoxie. (a)** En normoxie, HIF est modifié par une hydroxylation des prolylhydroxylases (PHD1, 2 et 3). Une enzyme E3 ubiquitine ligase peut venir lier HIF-1α pour l'ubiquitiner et le diriger vers le protéasome. **(b)** La faible tension en oxygène (O<sub>2</sub>) diminue l'activité des PHDs. HIF sera donc moins hydroxylé et les niveaux protéiques dans le cytosol vont augmenter. Ensuite, HIF sera transloqué au noyau où il s'hétérodimérise avec HIF-1β (ARNT). Ce complexe de deux sous-unités reconnaît des HREs sur les promoteurs des gènes cibles. Le schéma est valable pour les protéines homologues de la sous-unité α (HIF-2α et HIF-3α).

Adaptée de (Carroll et Ashcroft, 2005)

### 1.4.2 Structure des protéines HIFs

Les facteurs inductibles par l'hypoxie sont un groupe de quatre protéines hétérodimériques divisées en sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$ . Cette famille est constituée de trois membres homologues appartenant à la sous-unité  $\alpha$ , à savoir HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  et HIF-3 $\alpha$  qui sont sensibles au niveau d'oxygène dans le cytosol. Le membre constituant la sous-unité  $\beta$ , HIF-1 $\beta$  ou communément appelé translocateur nucléaire d'aryl hydrocarbure (ARNT), n'est pas sensible au niveau d'oxygène cytosolique et est constitutivement localisé dans le noyau (Masoud and Li 2015). Ces quatre protéines font partie de la famille à motif basique hélice-boucle-hélice-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS). Ce motif est connu pour former un complexe entre les sous-unités  $\alpha/\beta$  liant des HREs sur l'ADN, régulant ainsi l'expression de plus d'une centaine de gènes cibles. Ces protéines HIFs affichent des similarités avec leurs domaines protéiques reconnaissables qui les composent (figure 1.8). En plus du domaine bHLH, motif en épingle à cheveux liant l'ADN, les domaines PAS-A et PAS-B sont conservés chez les membres de cette famille (Semenza 2001). Les protéines HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  contiennent deux domaines de transactivation (TAD); NH<sub>2</sub> – terminal (N-TAD) et COOH-terminal (C-TAD) qui soutiennent son activité transcriptionnelle. Dans le cas de HIF-1 $\alpha$ , le domaine C-TAD interagit avec les coactivateurs (p300/CREB) pour moduler son transcrit sous conditions hypoxiques. Le domaine N-TAD de ces protéines est impliqué dans la stabilisation dans le cytosol pour prévenir la dégradation. De plus, les 3 sous-unités  $\alpha$  se distinguent de la sous-unité  $\beta$  par une région de dégradation dépendante de l'oxygène (ODDD), qui se trouve au niveau du domaine N-TAD, celui-ci étant important pour la régulation de la stabilité modulée par l'oxygène (Hellwig-Burgel, Stiehl et al. 2005, Hirota and Semenza 2006, Scheuermann, Yang et al. 2007).



**Figure 1.8 Représentation des domaines fonctionnels des protéines HIFs.** HIF-1α et HIF-2α affichent une haute homologie de séquence et tous deux détiennent deux domaines de transactivation distincts; N-TAD et C-TAD. HIF-3α ne présente qu'un seul domaine de transactivation NH<sub>2</sub>-terminal (N-TAD).  
Modifiée de (Ke and Costa 2006, Zhang, Yao et al. 2014, Wu, Potluri et al. 2015)

Les trois membres homologues de la sous-unité  $\alpha$  ne sont pas redondants puisqu'ils servent différents rôles durant le développement et ce malgré leurs similitudes structurales et fonctionnelles. Des modèles de souris transgéniques ont montré que HIF-1α et HIF-2α n'avaient pas la même incidence sur le développement bien qu'ils aient une activité similaire sur les gènes rapporteurs d'HRE (Wiesener, Turley et al. 1998, Hellwig-Burgel, Stiehl et al. 2005). La séquence en acide aminé de HIF-2α est plus longue de 38 résidus et possède 48% d'homologie avec HIF-1α (Wiesener, Turley et al. 1998). Plusieurs études ont exposé l'implication ubiquitaire de HIF-1α dans la réponse cellulaire contre le stress hypoxique et cela a fait de lui une cible thérapeutique contre la progression tumorale (Xia, Choi et al. 2012). Toutefois, les récentes études proposent une nouvelle tendance concernant cette cible thérapeutique, en mettant de l'avant HIF-2α comme étant le candidat de prédilection pour la lutte contre les tumeurs solides. Entre autre, l'expression de HIF-2α est restreinte à certains tissus. On retrouve HIF-2α dans les cellules endothéliales,

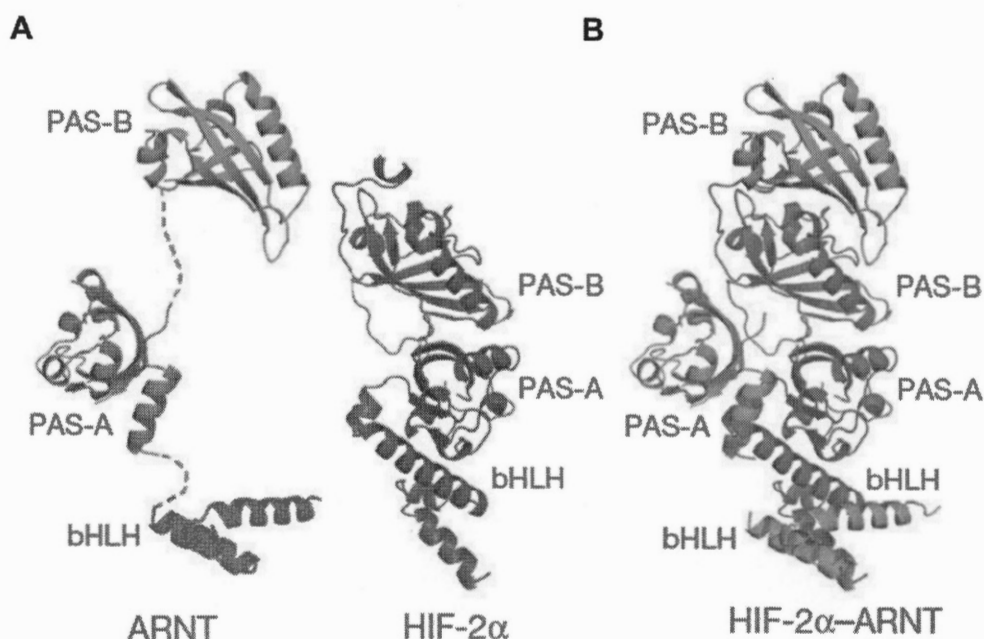
épithéliales et fibroblastes avec une surexpression dans les cellules cancéreuses, contrairement à son homologue HIF-1 $\alpha$  qui lui est ubiquitaire (Flamme, Frohlich et al. 1997, Wiesener, Turley et al. 1998). Cette différence entre les niveaux d'expression s'explique par le fait que HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  sont encodés par des gènes différents affichant des séquences promotrices divergeantes (*HIF1A* et *EPAS1* respectivement) (Tian, Hammer et al. 1998). HIF-3 $\alpha$  est quant à lui beaucoup moins décrit. Néanmoins, des études de génomique ont démontré son implication dans la régulation négative de la réponse angiogénique à travers l'épissage alternatif du transcrit d'une protéine du domaine PAS inhibiteur (IPAS) (Makino, Kanopka et al. 2002, Maynard, Evans et al. 2005). La séquence en acides aminés de HIF-3 $\alpha$  affiche une faible homologie avec ses homologues HIF-1/2 $\alpha$  (Gu, Moran et al. 1998, Ke and Costa 2006).

#### 1.4.3 HIF-2 $\alpha$ , cible thérapeutique pour le développement d'inhibiteurs

Au début des années 2000, HIF-1 $\alpha$  était la cible privilégiée pour le développement d'inhibiteurs de facteurs inductibles par l'hypoxie, dans le but de ralentir la croissance des cellules cancéreuses. L'engouement envers cette voie thérapeutique a permis le criblage *in vitro* d'un nombre important de molécules potentiellement inhibitrices. Cependant, les récentes études de caractérisation biophysique de l'homologue HIF-2 $\alpha$  et de son hétérodimérisation avec ARNT suscitent une nouvelle effervescence dans la recherche d'agents thérapeutiques ciblant HIF-2 $\alpha$ .

À cet égard, les études de cristallographie et de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont permis de mieux comprendre les détails moléculaires du complexe HIF-2 $\alpha$ /ARNT (Scheuermann, Yang et al. 2007). L'organisation spatiale des structures individuelles et hétérodimériques représentant les domaines fonctionnels bHLH et PAS-A/-B de ARNT et de HIF-2 $\alpha$ , révèle une haute similitude entre ces deux protéines (figure 1.9) (Wu, Potluri et al. 2015). Sous leur forme monomérique, on

remarque que les trois domaines d'ARNT sont éloignés les uns des autres et qu'ils ne forment pas de contacts inter-domaines. Cette caractéristique conformationnelle permet à ARNT de s'hétérodimériser avec les sous-unités  $\alpha$  (Wu, Potluri et al. 2015). À l'inverse, les trois domaines de HIF-2 $\alpha$  établissent des contacts entre eux pour former une structure compacte et globulaire. On observe également que les segments bHLHs des deux membres convergent pour créer une seule tête de lecture d'ADN et ce malgré l'asymétrie générale (Wu, Potluri et al. 2015).



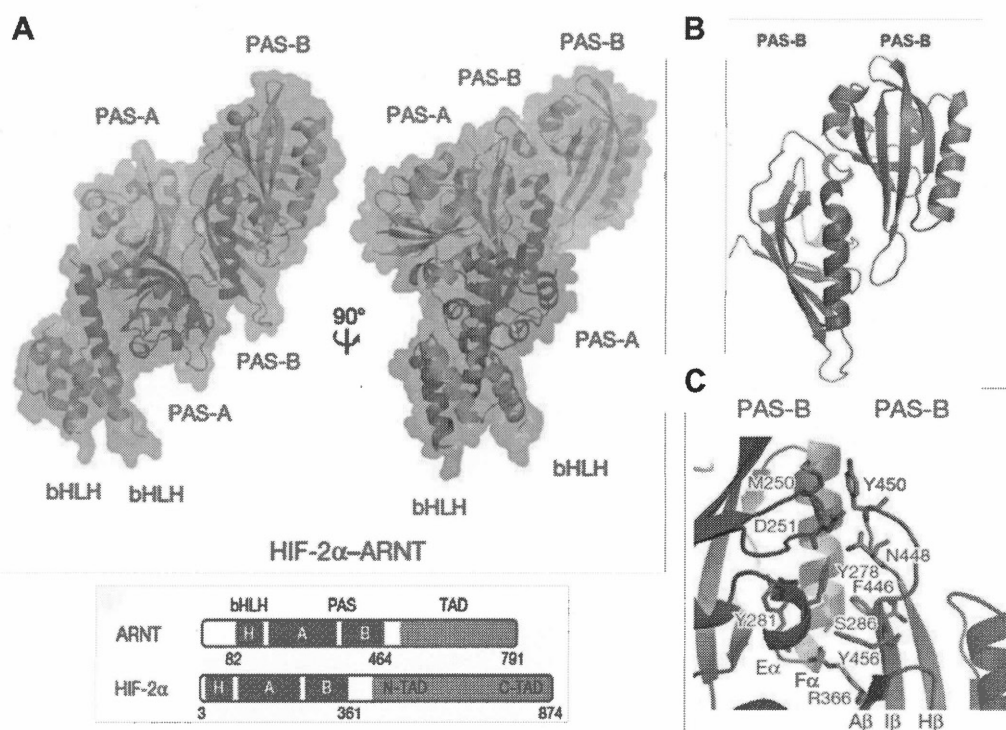
**Figure 1.9 Structures individuelles (A) et hétérodimériques (B) de ARNT et HIF-2 $\alpha$ .** Les trois domaines (bHLH, PAS-A et PAS-B) de ARNT (vert) et de HIF-2 $\alpha$  (violet) sont représentés en 3-dimensions. Les structures ont été obtenues par cristallographie aux rayons X, d'une résolution de 2,4 Å. Adaptée de (Wu, Potluri et al. 2015)



Chaque domaine de ces deux protéines forme des interactions domaine-domaine pour établir une charpente tertiaire qui s'emboîte parfaitement. Donc, les trois domaines d'ARNT pivotent et se tordent autour de la surface externe de la protéine HIF-2 $\alpha$ . L'arrangement asymétrique des sous-unités HIF-2 $\alpha$  et ARNT est remarquable, étant donné que chaque partenaire comporte les trois mêmes domaines conservés (figures 1.9, 1.10A). Conséquemment, des études ont démontré que l'interaction domaine-domaine au niveau des segments PAS-B est essentielle à la stabilité de l'hétérodimérisation de HIF-2 $\alpha$ /ARNT dans le noyau cellulaire (Scheuermann, Yang et al. 2007). Des mutations simples, ou doubles, au niveau des chaînes latérales d'acides aminés qui forment les contacts interfaciaux des domaines PAS-B de HIF-2 $\alpha$  et d'ARNT, sont suffisantes pour déstabiliser la conformation (figure 1.10B et C) (Wu, Potluri et al. 2015). Ces domaines PAS-B sont très bien conservés avec une homologie de séquence supérieure à 70% entre les membres de la sous-unité  $\alpha$ . Les structures cristallines des domaines PAS-B montrent également la présence d'une combinaison quasi équivalente de structures secondaires en hélice- $\alpha$  et de feuillet- $\beta$  (annexe D) (Wu, Potluri et al. 2015).

De manière similaire, au niveau du domaine PAS-B de HIF-2 $\alpha$ , il se trouve une région très sensible à la régulation allostérique modulée par de petites molécules. On retrouve dans ce domaine particulier de HIF-2 $\alpha$ , une cavité interne de 290 Å<sup>3</sup> (7 x 14 x 15 Å) qui peut être occupée par de l'eau ou des petites molécules synthétiques (Scheuermann, Tomchick et al. 2009, Scheuermann, Li et al. 2013). Des études de criblage par RMN ont révélé que cette pochette peut lier des ligands synthétiques avec une constante de dissociation ( $K_d$ ) de l'ordre du bas  $\mu$ M (Rogers, Bayeh et al. 2013). Ces ligands provoquent des changements conformationnels déstabilisant l'hétérodimérisation des domaines PAS-B. Malheureusement, ces études n'ont pas débouché sur des applications cliniques car les molécules chimiques étaient inaptes pour la caractérisation dans des modèles cellulaires pour

cause de toxicité. De plus, de par leur très faible biodisponibilité, ces molécules n'affichent pas des propriétés adéquates pour un médicament.



**Figure 1.10 Représentation générale de l'architecture hétérodimérique de HIF-2α et ARNT avec l'interface interactionnelle des domaines PAS-B. (A)** Structure globale en 3D de l'hétérodimérisation de HIF-2α (violet) avec ARNT (vert) avec un point de vue sur une rotation de 90°. L'organisation des domaines fonctionnels est également montrée. **(B)** Représentation de l'interface des domaines PAS-B. **(C)** Vue rapprochée de l'interface des domaines PAS-B avec les acides aminés impliqués dans la stabilité du dimère.

Adaptée de (Wu, Potluri et al. 2015)



## 1.5 Développement d'inhibiteurs d'interaction protéine-protéine

### 1.5.1 Interaction protéine-protéine

Les protéines sont une classe de biomolécules qui se distingue des autres de par leur ubiquité et leur abondance, représentant environ 50% du poids cellulaire (Jones and Thornton 1996, Pawson and Nash 2003). Le flux d'information dans la cellule est régulé et intégré par des interactions protéiques multiples, souvent par une utilisation combinée de petits domaines protéiques qui reconnaissent des ligands spécifiques (Voet, Voet et al. 2016). Un grand nombre de protéines régulant le comportement cellulaire via la transduction d'un signal, interagissent par le biais des interactions protéine-protéine (IPP) impliquant plusieurs petits domaines distincts ayant des spécificités structurales et physicochimiques spécifiques (figure 1.10) (Pellegrini, Haynor et al. 2004, Petsko, Ringe et al. 2008). De cette manière, les IPPs jouent un rôle clé dans la plupart des processus biologiques et offrent des opportunités intéressantes d'intervention thérapeutique, comme par exemple la conception d'agents pharmacologiques ciblant le cancer (Arkin and Wells 2004, Fry and Vassilev 2005). L'interaction entre deux protéines découle de leur conformation modulaire sous forme de structure secondaire qu'on désigne généralement comme site de reconnaissance ou domaine d'interaction protéique. Cette zone caractéristique est façonnée par des acides aminés qui sont à la base de ces interactions de nature hydrophobe, ionique, dipolaire et plus encore (Smith, Hu et al. 2006). La sélectivité et l'affinité de liaison entre les domaines protéiques varient selon les caractéristiques physicochimiques des forces qui soutiennent l'interaction entre ces protéines. Les protéines qui interagissent entre elles pour moduler les processus cellulaires n'ont pas toutes les mêmes affinités, puisque cela dépend de la fonction qui en résulte. Par exemple, une fonction de transmission de signal qui implique des interactions transitoires plus ou moins faibles entre les domaines protéiques, ne sera pas régie par les mêmes forces de liaison qu'une fonction

structurale ou de transport, qui implique des interactions d'affinité élevées (Drewes and Bouwmeester 2003, Pellicena and Kuriyan 2006, Keskin, Gursoy et al. 2008).

### 1.5.2 Développement d'inhibiteurs d'IPPs

Les pathologies liées aux cancers sont au cœur de nombreuses études et avec une tendance qui ne cesse de croître depuis la fin du 20<sup>ème</sup> siècle. À l'heure actuelle, il n'existe aucun remède universel pour traiter le cancer. Néanmoins, une combinaison de plusieurs types de traitements, tels que la chimiothérapie, la radiothérapie l'immunothérapie, l'hormonothérapie et la chirurgie sont réunis pour venir à bout de la maladie. Le fait est que les cancers sont orchestrés de façon anarchique et impliquent différentes voies de signalisation au sein de la cellule cancéreuse, lui permettant de résister aux thérapies anticancers. Avec la démystification de ces voies de signalisation par la compréhension des unités protéiques qui les gouvernent, de nouvelles thérapies plus adaptées verront le jour à travers le développement de molécules inhibitrices. Notamment, les IPPs représentent un point stratégique pour le développement de petites molécules inhibitrices (Loregian and Palù 2005).

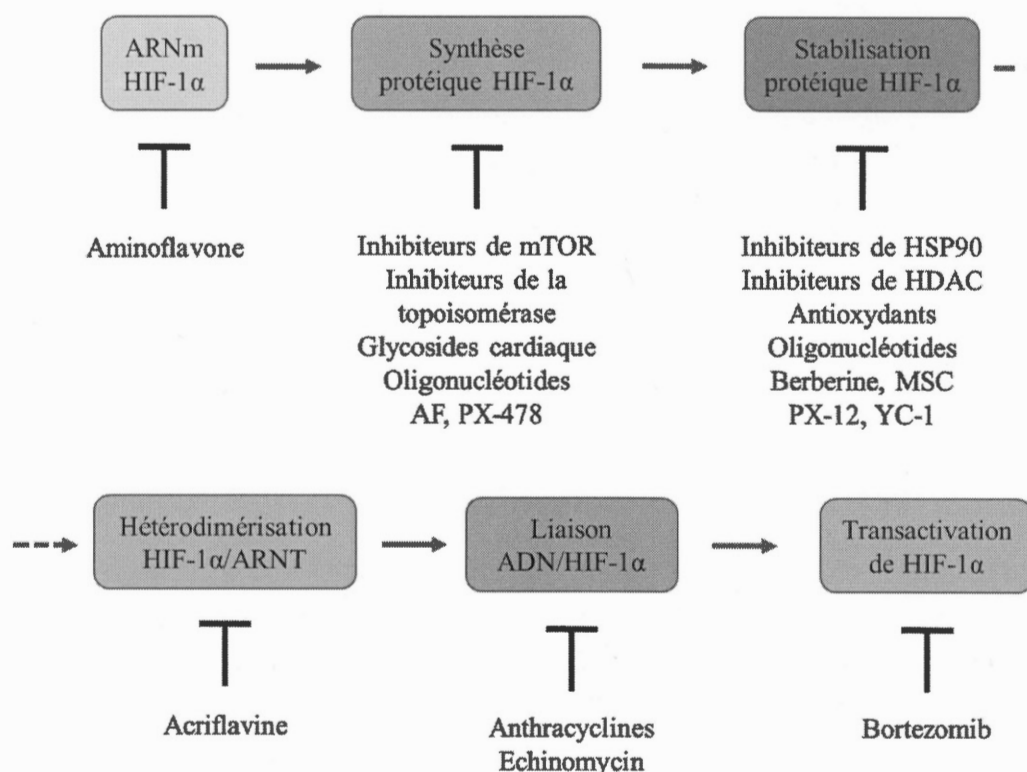
À ce propos, le développement de médicaments est une jonction des plus importantes entre la biochimie, la chimie et la médecine. C'est un domaine confronté à de multiples défis et le moins que l'on puisse dire fastidieux. En effet, le processus de recherche et développement (R&D) dans l'industrie pharmaceutique n'est couronné de succès que pour environ une molécule sur 10 000 testées sur une longue période de temps (Page 1999, Fauvelle and Fauvelle 2012). Heureusement, l'affinement des technologies a permis des avancées majeures dans l'étude structurale et fonctionnelle des protéines, incluant les approches bio-informatiques pour le développement d'agents thérapeutiques. Ainsi, des méthodes *in silico*, permettent d'accélérer la R&D lorsqu'elles sont utilisées en amont du processus de

recherche en voie de sélection de molécules potentiellement médicamenteuses. Ces techniques reposent sur des simulations numériques plutôt qu'expérimentales pour l'élaboration de modèles qui reflètent au mieux les événements interactionnels des systèmes biologiques complexes.

### 1.5.3 Inhibiteurs des HIFs

La voie de signalisation activant les HIFs peut être inhibée via différentes stratégies. En utilisant HIF-1 $\alpha$  comme référence, plusieurs molécules ont été identifiées comme étant antagonistes de son activation via des mécanismes variés, tel que; (i) la synthèse protéique de HIF-1 $\alpha$ , (ii) sa stabilisation dans le cytosol, (iii) son hétérodimérisation avec ARNT et (iv) son interaction avec les co-activateurs et d'autres protéines (Semenza 2012, Xia, Choi et al. 2012). La majorité de ces molécules ont un effet antagoniste en amont de la voie d'activation, ciblant la synthèse protéique du facteur inductible par l'hypoxie (figure 1.11) (Burroughs, Kaluz et al. 2013). Malheureusement, ces inhibiteurs présentent un faible taux de réussite, entre autre à cause de la complexité du métabolisme tumoral et de sa régulation par des voies de signalisation multiples et diversifiées. Si bien que le développement d'inhibiteurs anticancer vire le plus souvent à l'échec, soit 70% pour les essais de phase II et 60% des essais de phase III (Kola and Landis 2004). En outre, les récentes études cristallographiques concernant les facteurs inductibles par l'hypoxie ont ouvert la voie à une nouvelle génération de petites molécules inhibitrices de HIFs. À cet égard, de nouvelles caractéristiques structurales décelées sur HIF-2 $\alpha$  viennent de réactualiser le développement de médicaments ciblant ces facteurs. Concrètement, à l'inverse de HIF-1 $\alpha$  qui a été la cible privilégiée pour la quête de molécules inhibitrices, HIF-2 $\alpha$  présente au niveau de sa structure une caractéristique très favorable à la liaison de molécules potentiellement inhibitrices. Une cavité interne de 290 Å<sup>3</sup> à l'interface des domaines PAS-B, directement responsable de la stabilité de l'hétérodimérisation de HIF-2 $\alpha$ /ARNT devient donc

un site de prédilection pour la liaison de petites molécules (Key, Scheuermann et al. 2009, Scheuermann, Tomchick et al. 2009). De cette manière, cette caractéristique vient relancer la recherche de petites molécules dans l'ultime but de développer un médicament inhibant l'activité de HIF-2 $\alpha$  via son hétérodimérisation avec ARNT et pouvant ultimement ralentir la progression tumorale en bloquant la réponse adaptative à l'hypoxie.



**Figure 1.11 Représentation des cibles stratégiques désignées par les agents thérapeutiques inhibant l'activité de HIF-1 $\alpha$ .** Les étapes requises pour la transactivation de gènes cibles par HIF-1 $\alpha$  sont montrées dans les cases colorées et les médicaments qui inhibent chaque étape sont montrés ci-dessous. Les agents mentionnés ci-dessus sont destinés à être illustratifs et non exhaustifs. AF : aminoflavone; MSC : Se-méthylsélénocystéine.

Adaptée de (Semenza 2012)



## 1.6 Problématique et sujet d'étude

Les facteurs inductibles à l'hypoxie sont les acteurs qui coordonnent la réponse cellulaire maintenant l'homéostasie de l'oxygène moléculaire. Les protéines HIFs actives constituent un hétérodimère composé d'un domaine sensible à l'oxygène (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  ou HIF-3 $\alpha$ ) et d'un translocateur nucléaire exprimé de façon constitutive (ARNT). L'instabilité de la régulation post-traductionnelle des sous-unités  $\alpha$  des HIFs, modulant sa dégradation protéosomale et la régulation du niveau de protéines, est en étroite relation avec la progression tumorale agressive. Sous les conditions hypoxiques observées dans les foyers tumoraux mal vascularisés, les hydroxylases impliquées dans la déstabilisation des HIFs sont inactivées, accordant ainsi aux sous-unités  $\alpha$  une stabilité cytosolique. Sous ces conditions, HIFs- $\alpha$  non modifiés peuvent lier ARNT et cet hétérodimère actif contrôle en aval l'expression de plus de 100 gènes qui soutiennent l'adaptation cellulaire à l'hypoxie, favorisant la prolifération des cellules cancéreuses, les métastases et la résistance aux traitements. De cette façon, l'inhibition de l'interaction, HIF- $\alpha$ /ARNT devient intéressante pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre le cancer.

Il a été démontré que cette hétérodimérisation protéique est induite et stabilisée par l'interaction entre leurs domaines PAS-B. Or, les IPPs modulées par le domaine PAS sont présentes dans de nombreux autres systèmes et peuvent être régulées par une modification conformationnelle allostérique induite par la liaison de cofacteurs au cœur du domaine lui-même. Cela nous indique donc que le domaine PAS-B des HIFs peut potentiellement être modulé par la liaison de petites molécules dans le noyau et ultimement inhiber la dimérisation et l'activation de HIF. Plus particulièrement, la structure cristalline par rayons X du domaine PAS-B de HIF-2 $\alpha$  a mis en lumière une cavité occupée par des molécules d'eau au sein de ce domaine. La liaison d'un agent dans cette cavité entraînerait un changement conformationnel,

déstabilisant les interactions entre HIF-2 $\alpha$  et ARNT. Bien que certaines études aient récemment porté sur la conception et l'identification de petites molécules antagonistes de l'activation de HIF-2 $\alpha$ , les composés identifiés jusqu'à présent affichent une puissance insuffisante. Les propriétés physicochimiques et les paramètres pharmacocinétiques de ces composés sont inadéquats pour leur utilisation en tant qu'agents médicamenteux. Dans ce contexte, l'étude en question repose sur le potentiel majeur que représente cette interaction protéine-protéine pour le développement d'agents sélectifs.

### 1.6.2 Objectifs de recherche

L'objectif global de cette recherche est de mettre en places des essais de criblage d'inhibiteurs de facteurs inductibles par l'hypoxie. Pour y parvenir, les sous-objectifs suivants devront être exécutés.

#### 1. Production et purification des protéines :

Mettre au point un protocole d'expression et de purification par modèle bactérien, où les domaines PAS-B respectifs de HIF-2 $\alpha$  et ARNT seront obtenus. Le design de ces domaines doit être opéré de sorte à envisager l'étude interactionnelle *in vitro*.

#### 2. Vérifier la stabilité structurale des protéines :

Examen de la stabilité conformationnelle des protéines par le biais d'une technique spectroscopique rapide et non-destructive, le dichroïsme circulaire (CD).

#### 3. Validation de l'hétérodimérisation des HIFs :

Une analyse de l'hétérodimérisation des domaines PAS-B au moyen de techniques, telles que la résonance de plasmon de surface (SPR) et l'AlphaScreen™.

#### 4. Essais de criblage d'inhibiteurs des HIFs :

Validation des essais avec l'utilisation d'inhibiteurs de références connus et caractérisés dans la littérature. Essais de la nouvelle génération de molécules inhibitrices en développement.

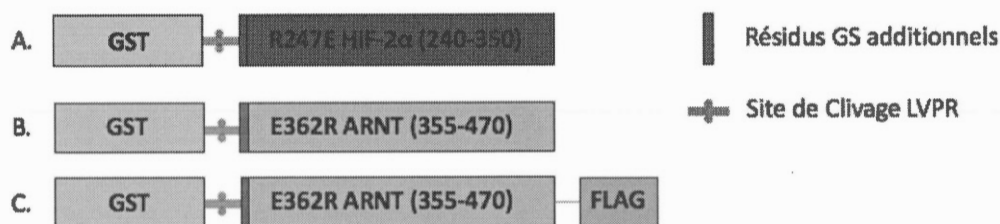


## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODE

#### 2.1 Design et choix du vecteur

Pour la réalisation de ce projet, trois constructions plasmidiques ont été préconisées (Cardoso, Love et al. 2012). Deux plasmides ont été générés en insérant distinctement le domaine PAS-B de HIF-2 $\alpha$  (R247E HIF-2 $\alpha$  (240-350)) et celui de ARNT (E362R ARNT (355-470)) dans un vecteur pGEX-4T-1 avec une étiquette GST en N-terminale et un site de clivage (LVPR) pour la thrombine, suivie de deux résidus (GS) additionnels avant l'insertion du domaine PAS-B. La troisième construction a été générée avec l'ajout d'une étiquette Flag en C-terminal d'ARNT. Les gènes ont été sous-clonés par l'intermédiaire des sites de restrictions BamHI et SalI. L'ensemble de ces constructions plasmidiques a été fournie par GenScript (USA).



**Figure 2.1 Schéma des trois constructions plasmidiques.** Le clonage est réalisé dans le vecteur pGEX-4T-1. L'étiquette GST se trouve en N-terminal et pour la construction C), une étiquette Flag a été ajoutée en C-terminal. Le site de clivage de la trombine est entre l'étiquette de purification GST et le domaine PAS-B, séparé par deux résidus GS additionnels.

## 2.2 Expression et production protéique

### 2.2.1 Transformation bactérienne par choc thermique

Une fois les plasmides reçus, une transformation par choc thermique a été réalisée avec deux souches bactériennes distinctes : *Escherichia Coli* (*E. coli*) BL21 DE3 (New England BioLabs) pour la production des protéines de fusions et *E. coli* DH5α (Invitrogen™) pour l'amplification plasmidique. Les cellules compétentes *E. coli* DH5α et BL21 DE3 conservées à -80°C ont été décongelées lentement sur glace. Par la suite, 100 ng des solutions plasmidiques ont été ajoutées à 20 µL de chacune des souches bactériennes et placées sur glace pendant 30 minutes. Puis, un choc thermique dans un bain marie à 42°C pour 45 secondes a été effectué pour ensuite être remis sur glace 2 minutes. Sous condition stérile, 200 µL de milieu LB (10 g/L peptone, 5 g/L extrait de levure et 10 g/L NaCl) sans antibiotique a été ajouté. La solution a été mélangée par inversion puis incubée 45 minutes à 37°C avec une légère agitation. Une fois l'incubation terminée, 50 µL et 150 µL ont été

étalés sur des pétris de LB agar (10 g/L peptone, 5 g/L extrait de levure, 10 g/L NaCl et 15 g/L agar) contenant 100 µg/mL d'ampicilline et incubé 16 heures à 37°C.

### 2.2.2 Amplification et extraction des plasmides

Une colonie d'*E. coli*. DH5α contenant l'un des gènes de fusion a été sélectionnée sur un pétris sélectif et inoculée dans un tube contenant 5 mL de milieu LB avec 75 µg/mL d'ampicilline. La culture bactérienne a été incubée à 37°C pour la nuit (16-18h) sous agitation. La culture bactérienne a été centrifugée à 3000 × g pendant 3 minutes à température ambiante (25°C). Le culot bactérien a ensuite été lysé pour l'extraction plasmidique telle qu'indiqué dans le guide de QIAprep Spin Miniprep Kit. La concentration de l'ADN plasmidique extrait a été évaluée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 260 nm ( $A_{260}$ ) avec un instrument NanoDrop®.

### 2.2.3 Production des protéines recombinantes

Pour chacune des souches d'*E. coli* BL21 DE3, 3 colonies ont été inoculées respectivement dans 20 mL de milieu LB à 75 µg/mL d'ampicilline puis incubées à 37°C sous agitation toute une nuit. Ensuite, le volume final des pré-cultures a été ramené à 500 mL en ajoutant du milieu LB avec antibiotique, suivi de nouveau avec une incubation sous les mêmes conditions, jusqu'à l'obtention d'une densité optique (D.O.) de 0,6 - 0,8 à une longueur d'onde de 600 nm. Lorsque la valeur de D.O. recherchée a été atteinte, l'expression génique des différentes cultures bactériennes en phase exponentielle a été induite en ajoutant l'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) à une concentration finale de 1 mM, avant d'être à nouveau incubées à 20°C pendant 16 heures sous agitation. Les bactéries exprimant les protéines d'intérêts ont été recueillies par centrifugation à 3000 × g à 4°C pendant 20 minutes. Les

culots ont été conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à extraction et purification des protéines d'intérêt.

## 2.3 Purification protéique

### 2.3.1 Lyse bactérienne

Les culots bactériens ont été décongelés sur glace avant d'être resuspendus avec 50 mL (1/10 volume de culture) de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 3 mM DTT, 1 mM PMSF) puis incubés à  $4^{\circ}\text{C}$  pour 20 minutes. Une fois l'incubation terminée, une centrifugation a été effectuée à  $16\,000 \times g$  à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes. Le surnageant a été délicatement récupéré et dilué dans 100 mL de PBS 1X (137 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,7 mM KCl, 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) stérile, puis le tout est filtré avec une membrane de  $0,45\,\mu\text{m}$  et dégazé pendant 10 minutes sur glace. Des échantillons de chacune des étapes ont été conservés pour l'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de dodécylsulphate de sodium (SDS-PAGE) (section 2.4.1).

### 2.3.2 Chromatographie d'affinité et d'exclusion stérique

Avec l'utilisation d'un système ÄKTA pure (GE Healthcare), une colonne GST-Trap HP de 5 mL (GE Healthcare) a été équilibrée avec un tampon PBS 1X pH 7.4. L'injection de la solution protéique ( $\sim 50\,\text{mL}$ ) a ensuite été exécutée directement sur la colonne GST-Trap HP à un faible débit (1 mL/min) avant de laver à nouveau avec 30 mL de PBS 1X au même débit. Des tubes en verre sont placés dans le collecteur à fraction F9-R (GE Healthcare) pour débiter l'élution avec une solution composée de 50 mM Tris-HCl pH 8.0 et de 10 mM glutathion réduit (GSH). Des fractions de 0,5 mL à un débit de 2,5 mL/min sont récoltées. Les fractions sont

ensuite dosées en mesurant l'absorbance à 280 nm ( $A_{280}$ ) dans une cuvette en quartz et les plus concentrées sont jumelées pour être dialysées 16 heures à 4°C contre un tampon PBS 1X pH 7.4 à l'aide de cassettes Slide-A-Lyzer™ (Thermo Scientific) en suivant les recommandations techniques du fabricant. Une partie de l'échantillon a été conservée à -80°C pour la réalisation des tests biophysiques, une pour le clivage de l'étiquette et une autre pour l'analyse par (SDS-PAGE) (section 2.4.1).

### 2.3.3 Clivage de l'étiquette

L'étiquette GST ayant servi à la purification par chromatographie d'affinité est enlevée des protéines d'intérêt (HIF-2 $\alpha$  ou ARNT) par clivage en solution par la thrombine (GE Healthcare). La thrombine (20 unités/g) est ajoutée aux solutions protéiques dans le PBS 1X pH 7.4 et les solutions ont été incubées à 22°C pour 16 heures. La colonne GSTrap HP est jointe à une colonne HP Benzamidine FF (GE Healthcare) de 1 mL pour l'élimination de la thrombine, puis le tout a été fixé sur le système ÄKTA pur avant de procéder à l'équilibration des colonnes avec du PBS 1X (2 mL/min) pendant 15 minutes. Des échantillons de chacune des étapes de purification ont été mis de côté pour l'analyse sur gel SDS-PAGE. Le reste a été aliquoté, puis rapidement congelé dans l'azote liquide avant d'être conservé à -80°C pour utilisation ultérieure.

## 2.4 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les échantillons à analyser ont été préparés à 1X final avec un tampon d'échantillon Laemmli 2X (BIO-RAD) contenant 10% de  $\beta$ -mercaptoéthanol, puis chauffés pendant 5 minutes à 95°C. Les échantillons ont été chargés sur gel de polyacrylamide (12.5%), ainsi que le marqueur de poids moléculaire Precision Plus Protein™ All Blue (BIO-RAD). Dans un tampon de migration (25 mM Tris pH 8.3,

192 mM glycine, 0.1% SDS), la séparation a été amorcée à 60 V pendant 15 minutes et poursuivie à 250 V, jusqu'à ce que la bande de migration sorte du gel. Le gel a été ensuite délicatement lavé dans de l'eau distillée 3 fois, une dizaine de minutes. L'eau a été retirée pour poursuivre avec la coloration au bleu de Coomassie. Ensuite, le gel a été lavé 3 fois pendant 15 minutes avec une solution de décoloration (10% acide acétique, 40% méthanol) avant l'analyse par l'imageur ChemiDoc MP (BIO-RAD).

## 2.5 Immunobuvardage de type Western

Suite à électrophorèse (section 2.4), un transfert d'une heure à 500 mA a été réalisé sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) de 0,45  $\mu$ m de porosité dans un tampon de transfert (25mM Tris pH 8.3, 192 mM glycine, 20% méthanol). La membrane PVDF a ensuite été incubée une heure à température pièce sous agitation dans une solution de blocage TBS-T (20 mM Tris pH 7.4, 137 mM NaCl, 0,1% Tween 20) contenant 5% de lait écrémé en poudre, puis lavée 3 fois dans du TBS-T. La membrane a été incubée une heure à température pièce avec différents anticorps primaires (1 : 5000, GST (91G1) Rabbit mAb #2625 (Cell Signaling) et 1 : 1000, Anti-FLAG M2 #14793 (Cell Signaling)) dilués dans du TBS-T. Une seconde incubation aux mêmes conditions a été cette fois-ci effectuée avec l'anticorps secondaire (1 : 10 000, Anti-rabbit IgG #7074 (Cell Signaling)). Les membranes ont été lavées après chaque incubation dans le TBS-T à 3 reprises pendant 15 minutes. Finalement, les membranes PVDFs ont été incubées pendant 1 min dans une solution de chemiluminescence (ECL) pour être révélées sur l'imageur ChemiDoc MP.



## 2.6 Spectroscopie par dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire (CD) dans l'ultra-violet lointain ont été enregistrés à température ambiante en utilisant un spectrophotomètre J-810 (Jasco). Les solutions protéiques avec ou sans étiquette ont été préparées dans un tampon phosphate (10 mM phosphate pH 7.4, 100 mM NaCl) à une concentration finale de 5  $\mu$ M. Tous les spectres ont été mesurés de 190 à 260 nm et ont été corrigés en soustrayant le signal de la solution de tampon phosphate (blanc). Une cuvette de quartz de 1 mm a été utilisée. Les solutions protéiques peuvent être récupérées pour les manipulations qui suivent puisque ce test est non destructif.

## 2.7 Résonance des plasmons de surface

L'analyse de l'hétérodimérisation des HIFs a été effectuée à l'aide d'un instrument Biacore T200 (GE Healthcare). Un anticorps de lapin GST A190-122A (Bethyl Laboratories) a été immobilisé sur une puce de capteur CM5 de dextran carboxyméthylée (GE Healthcare) en utilisant une stratégie de couplage amine. Brièvement, la surface de la puce a été préalablement activée avec un mélange 1 : 1 de N-hydroxysuccinimide (NHS) (0,1 M) et de 3-(N-diméthylamino)-propyl-N-éthylcarbonimide (EDC) (0,4 M). Il s'en suit d'une injection d'une solution d'anticorps GST A190-122A (20  $\mu$ g/ml) dans un tampon Acétate (10 mM Sodium Acétate pH 5.5) à un débit de 10  $\mu$ L/min pendant 360 secondes pour atteindre un niveau d'immobilisation de 3500 RU. Les surfaces de la puce (protéine et référence) ont été bloquées par l'injection d'une solution éthanolamine (1 M, pH 8.5). La cinétique de liaison a été évaluée en procédant d'abord par la capture de GST-domaine PAS-B (15  $\mu$ M; ligand) via une injection (10  $\mu$ L/min) dans un tampon d'essai (PBS 1X pH 7.4, 0,05% Tween-20) pour ensuite injecter la protéine d'interaction non étiquetée (analyte) à des concentrations croissantes (0,5 à 2,0 M) dans les mêmes conditions. Toutes les étapes des essais ont été effectuées à

température ambiante. La puce CM5 a été régénérée en injectant 20  $\mu\text{L}$  d'une solution de NaOH 50 mM à un débit de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Les sensogrammes de liaison ont été obtenus en soustrayant le flux de la surface de référence. Les analyses des données ont été effectuées à l'aide du logiciel d'évaluation BIA (GE Healthcare) et s'adaptent à un modèle de liaison de Langmuir à un seul site.

## **2.8 Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay (AlphaScreen™)**

Les solutions protéiques étiquetées (GST-HIF-2 $\alpha$  et ARNT-Flag) ont été mélangées de sorte à former une matrice 2D à différentes concentrations, allant de 0 à 300 nM dans le tampon Immunoassay 1X (PerkinElmer) puis distribuées dans une plaque blanche de 96 puits (PerkinElmer). Suite à l'application d'une membrane empêchant l'évaporation, les échantillons ont été incubés à température ambiante pendant 1 heure en combinaison matricielle de sorte à tester différentes concentrations. Par la suite, à l'abri de la lumière, une solution contenant un mélange précis des billes donneuses GSH (PerkinElmer) et billes acceptuses Anti-FLAG (PerkinElmer) dans le tampon Immunoassay 1X (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration finale de chaque billes) a été ajoutée dans chacun des puits. Le volume final de la réaction (Protéine-protéine + billes) a été de 30  $\mu\text{L}$  par puit. Une dernière incubation (1h, température pièce) a été réalisée avant l'acquisition du signal d'AlphaScreen par l'instrument Infinite® M1000 PRO (TECAN).

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

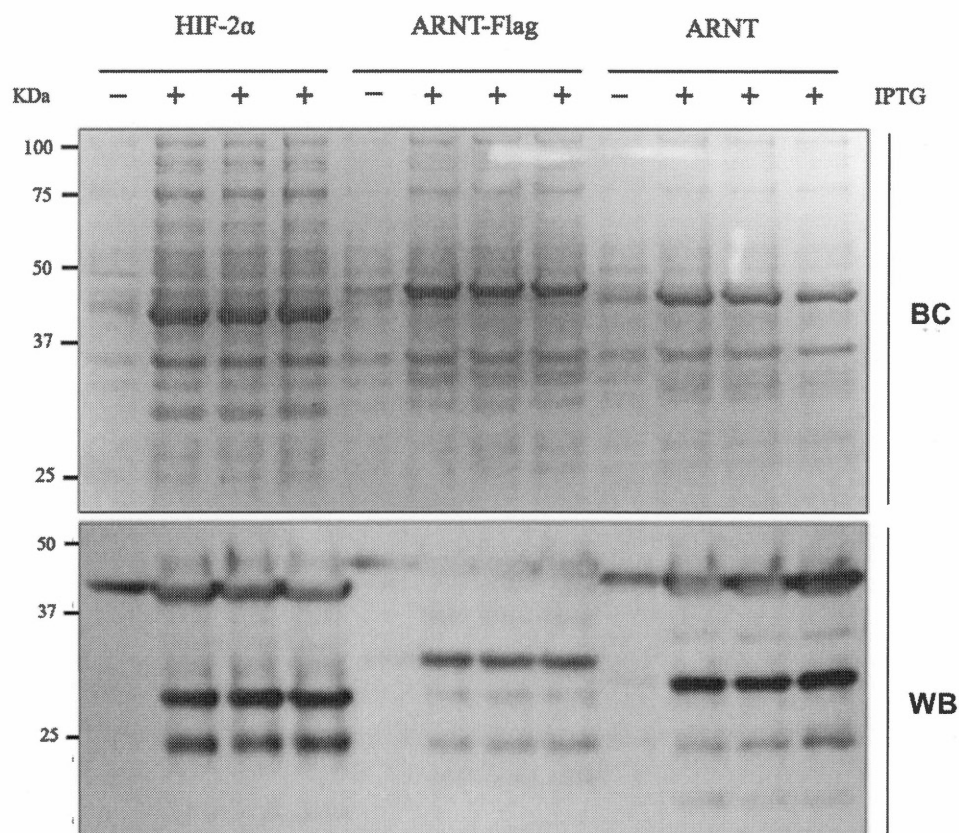
#### 3.1 Transfection d'*E. coli* (DE3) avec pGEX-4T-1

Pour maximiser l'échéancier de ce travail, nous avons décidé de faire appel à GenScript® (USA) pour la synthèse des gènes et le clonage dans le vecteur pGEX-4T-1 (figure 2.1). L'insertion du vecteur (annexe A) dans les bactéries d'*E. coli*. BL21 (DE3) a été réalisée et mis sur plaque de gélose à base de milieu LB pour la culture de colonies compétentes. Pour chacune des constructions (GST-HIF-2 $\alpha$ , GST-ARNT, GST-ARNT-Flag), trois colonies ont été prélevées pour vérifier l'expression des protéines de fusion contenant les domaines PAS-B d'intérêt. À petite échelle, des milieux LB liquides ont été inoculés avec les colonies bactériennes et suite à l'atteinte de la phase exponentielle de croissance (D.O. de 0.6 - 0.8), on provoque l'induction avec (+) 1mM IPTG ou sans (-). Donc, une analyse par SDS-PAGE de l'expression plasmidique des trois souches d'*E. coli* (DE3) transformées avec pGEX-4T-1 est réalisée en examinant le profil migratoire des protéines de fusions dans le lysat total (figure 3.1). On observe par coloration au bleu de Coomassie (BC) le profil migratoire des protéines solubles des lysats pour les trois colonies induite (+) par l'IPTG et une seule colonie non induite (-) de chacune des constructions plasmidiques. De façon nette, de vives bandes épaisses sont visibles au niveau des poids moléculaires respectifs des trois constructions; GST-HIF-2 $\alpha$  : 39,8 kDa, GST-ARNT-Flag : 42 kDa et GST-ARNT : 40,4 kDa.

De plus, on remarque que l'induction avec l'IPTG entraîne des niveaux d'expression similaires entre les trois différentes colonies de chaque construction plasmidique.

Ensuite, nous avons procédé à un immunobuvardage de type western (WB) dirigé contre l'étiquette GST présente dans les trois constructions et servant à la purification par chromatographie d'affinité. On remarque que le profil migratoire des protéines de fusion des colonies bactériennes induit par l'IPTG est caractérisé par la présence de fragments de sous-produits protéiques résultant d'une activité lytique endogène. Concrètement, on discerne pour les trois souches bactériennes des bandes à 25 kDa propre à l'étiquette GST, ainsi que des bandes intermédiaires (30-33 kDa) contenant non seulement l'étiquette GST, mais également un petit segment du domaine PAS-B. Concernant les colonies non induites par l'IPTG, on note de façon surprenante une bande très apparente, signe d'une expression basale des protéines de fusion. Cette particularité peut être expliquée par l'utilisation d'une longue incubation de 16 -18 heures qui aurait permis un bon niveau d'expression sans même l'ajout de l'IPTG. Par ailleurs, on remarque que pour la construction du domaine PAS-B de ARNT-Flag, le signal révélé par l'appareil ChemiDoc MP (BIO-RAD) est en quelque sorte atténué, mais en réalité c'est plutôt l'inverse. En effet, c'est un très fort signal possiblement conséquent à une longue exposition à la solution de révélation ECL qui a brûlé en partie le substrat de la chimiluminescence. Quoiqu'il en soit, ce résultat obtenu par immunobuvardage n'est pas utilisé pour la quantification, mais uniquement pour valider l'identité des bandes de migration.

Suite à l'analyse de l'expression plasmidique chez trois souches bactériennes de nos constructions plasmidiques, nous avons modifié la composition du tampon de lyse par l'ajout de 1 mM d'inhibiteurs de protéases à sérines (PMSF) et diminué la concentration en DTT à 3 mM pour réduire l'activité lytique des bactéries.



**Figure 3.1** Analyse par SDS-PAGE de l'expression plasmidique des trois souches d'*E. coli* (DE3) transformées avec pGEX-4T-1. Pour l'évaluation de l'expression protéique, 3 colonies différentes de chacune des constructions plasmidiques ont été ensemencées sur milieu LB. Le lysat bactérien des 3 colonies est montré en présence (+) et en absence (-) (uniquement pour 1 colonie) d'IPTG. L'expression est réalisée avec 1 mM d'IPTG suivie d'une incubation à 20°C pendant 16 heures. La migration est réalisée sur gels polyacrylamides (9%) à 60 V pour 15 minutes, puis à 250 V jusqu'à ce que les bandes sortent du gel. L'indicateur de poids moléculaire est le Precision Plus Protein™ All Blue (BIO-RAD) (bandes non illustrées). L'image a été prise avec le système ChemiDoc MP (BIO-RAD) suite à une coloration au bleu de Coomassie (BC) et un immunobuvardage de type western (WB) avec un anticorps GST (91G1) (1: 5000) (Cell Signaling).



### 3.2 Production des protéines recombinantes

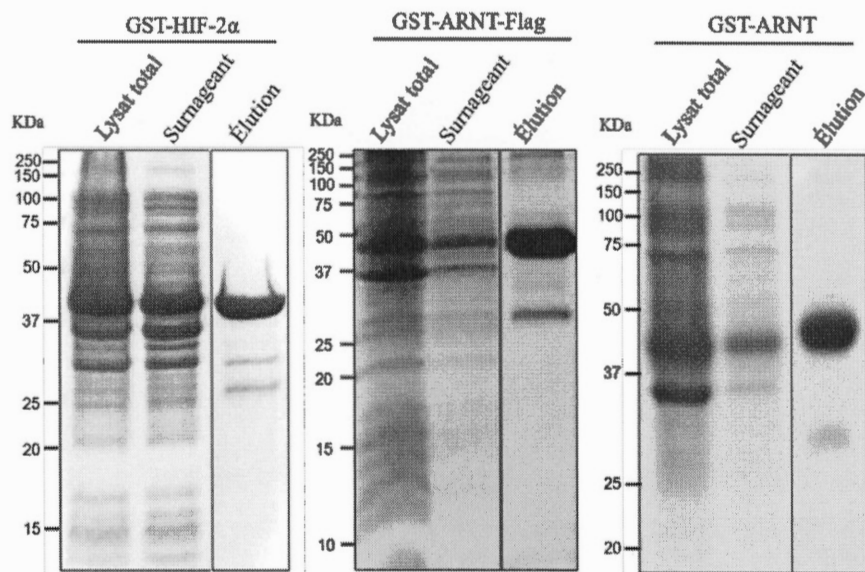
Une fois que l'expression des protéines d'intérêt a été vérifiée et que nous avons optimisé les conditions de lyse bactériennes, on est en mesure de mettre en place la procédure de purification qui repose essentiellement sur la chromatographie d'affinité. Puisque nous avons noté aucune différence entre les colonies induites sélectionnées, les trois sont équivalentes pour poursuivre les étapes de purification qui suivent. Nous n'avons convenu de travailler avec des volumes de culture bactérienne allant à 0,5 L, pour obtenir une quantité suffisante de protéines pour les essais biophysiques.

#### 3.2.1 Purification des protéines recombinantes

Lors des étapes de lyse et de purification, il est primordial de travailler à basse température (4°C) pour éviter d'amplifier le phénomène de dégradation des protéines (figure 3.1). Le système automatisé ÄKTA pure nous permet de suivre les étapes de purification par une mesure de  $A_{280}$ , de conductivité et de pH en temps réel. Ainsi, on récolte les éluions désirées suite au passage de la solution protéique au travers de la colonne de chromatographie d'affinité. Globalement, on observe à la figure 3.2 l'analyse par SDS-PAGE du processus de purification par chromatographie d'affinité. On note que pour chacune des trois protéines d'intérêt, la proportion de la protéine complète est résolument supérieure aux traces des sous-produits protéiques. Cela signifie qu'à cette étape-ci du procédé de purification, on est en présence de protéines plus ou moins purifiées avec des traces résiduelles de fragments de clivage. Néanmoins, ce résultat est plutôt encourageant puisque les tests d'expression plasmidiques réalisés à la figure 3.1 laissaient présager une proportion beaucoup plus importante de sous-produits de dégradation protéiques. Cette analyse nous a permis de valider rapidement notre concept de purification des



domaines PAS-B de ARNT et HIF-2 $\alpha$ , sans rencontrer de problèmes majeurs lors de ce processus qui parfois peut engendrer de sérieux problèmes.



**Figure 3.2 Analyse par SDS-PAGE du processus de purification protéique des trois souches d'*E. coli* (DE3) transformées avec pGEX-4T-1.** Le processus de purification de chaque plasmide est évalué en dévoilant le profil de migration en chargeant 15  $\mu$ L de Lysat total, de Surnageant et de l'Éluion. L'indicateur de poids moléculaire est le Precision Plus Protein™ All Blue (BIO-RAD) (bandes non illustrées). L'image a été prise avec le système ChemiDoc MP (BIO-RAD) suite à une coloration au bleu de Coomassie.

### 3.2.2 Clivage et purification des protéines sans étiquettes

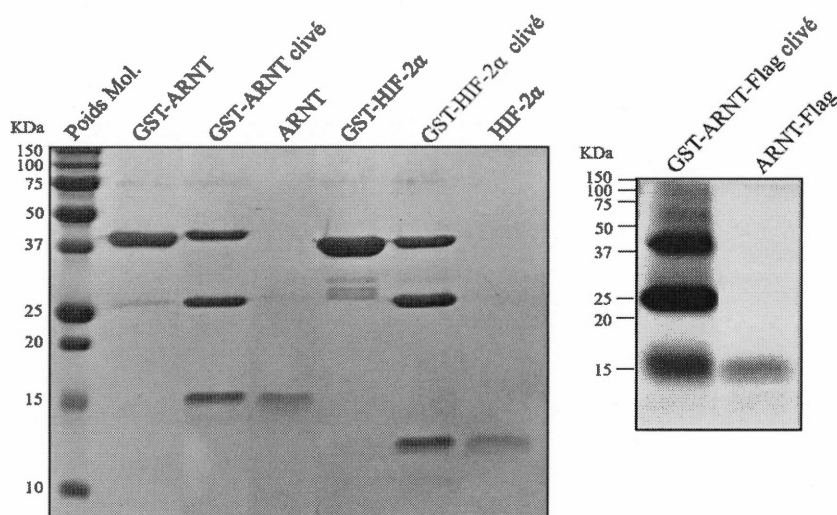
Dans le but de réaliser nos essais de résonance des plasmons de surface, il est important de récupérer dans un premier temps les protéines étiquetées GST-HIF-2 $\alpha$  et GST-ARNT et leurs homologues sans étiquettes. De même, pour l'AlphaScreen™, les protéines GST-HIF-2 $\alpha$  et ARNT-Flag seront utilisées. Ceci

implique donc un clivage pour les trois protéines chimériques, dans le but d'éliminer l'étiquette de purification GST. Concrètement, on a besoin des protéines GST-HIF-2 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , GST-ARNT, ARNT pour les essais de SPR. Avec l'utilisation d'un anticorps anti-GST immobilisé de façon covalente sur une surface carboxyméthylée, GST-HIF-2 $\alpha$  sera capturé avant de mesurer la cinétique de liaison d'ARNT et inversement avec la capture de GST-ARNT et la liaison de la protéine HIF-2 $\alpha$ . L'Alphascreen™ nécessite seulement GST-HIF-2 $\alpha$  et ARNT-Flag qui seront immobilisés sur les billes donneuses greffées d'un anticorps anti-GST et les billes acceptuses greffées d'un anticorps anti-Flag. Les détails concernant ces approches seront traités à la section 3.4 et 3.5.

Suite à la récupération des protéines de fusion après élution de la colonne GST à l'aide du glutathion (GSH), il importe de réaliser plusieurs cycles de chromatographie d'exclusion stérique pour deux raisons. D'une part, il faut changer le tampon dans lequel les protéines récoltées se retrouvent après élution afin de procéder au clivage avec la thrombine. D'autre part, la chromatographie d'exclusion stérique nous permet d'enlever les agrégats possiblement présents en solution et plus ou moins visibles sur les gels SDS-PAGE. Particulièrement, cette seconde étape de purification permet d'enlever les protéines étiquetées non clivées et les fragments de clivage non spécifiques (annexe C). De cette façon, les protéines non étiquetées ont subi plusieurs cycles sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique avant d'être reconcentrées et divisées en deux parties: l'une pour les essais interactionnelles et l'autre pour le clivage par thrombine.

Ainsi, on observe par l'analyse SDS-PAGE le processus de purification avant et après clivage des trois constructions contenant le domaine PAS-B d'intérêt (figure 3.3). On remarque pour GST-HIF-2 $\alpha$  et GST-ARNT que la présence de fragments de dégradation (GST; bande à 26 kDa) a été réduite (figure 3.3A). On peut également avoir une appréciation de la qualité du clivage réalisé par la thrombine,

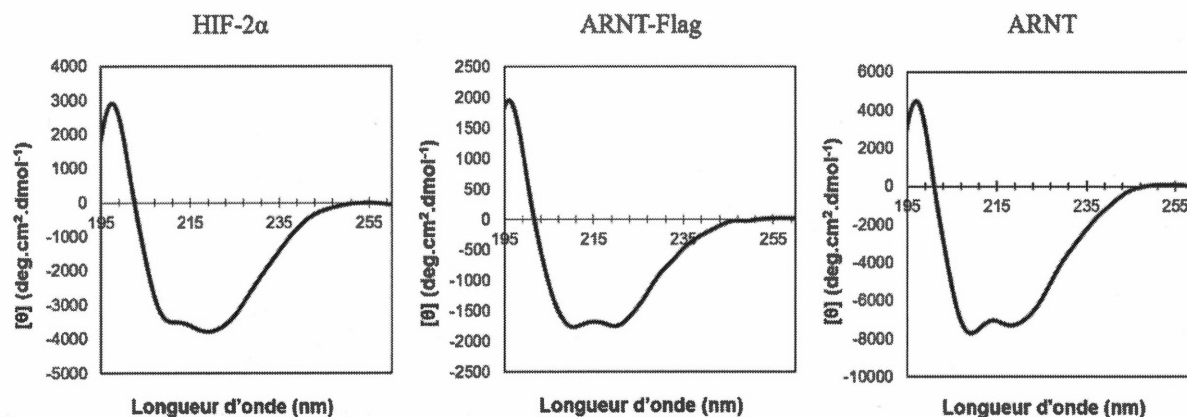
avec un rendement estimé à 60%. Les protéines clivées sans étiquettes ont été récupérées en purifiant la solution de protéines dans un montage d'une colonne GSTrap et d'une colonne HP Benzamidine FF (GE Healthcare). On note que les protéines sans étiquettes sont dépourvues de toutes traces de fragments protéiques non-désirables et un rendement d'environ 50% sur la fraction clivée est observé.



**Figure 3.3 Analyse par SDS-PAGE de la purification protéique après clivage par la thrombine.** La pureté des protéines avec ou sans étiquettes servant aux essais de SPR et d'AlphaScreen a été évaluée. La migration est réalisée sur gels polyacrylamide (9%) à 60 V pour 15 minutes, puis à 250 V jusqu'à ce que les bandes sortent du gel. L'indicateur de poids moléculaire est le Precision Plus Protein™ All Blue (BIO-RAD). L'image a été prise avec le système ChemiDoc MP (BIO-RAD) suite à une coloration au bleu de Coomassie.

### 3.3 Analyse de la stabilité conformationnelle des protéines purifiées

Lors des étapes d'extraction, d'isolation, de purification et de clivage, les protéines ont subi des conditions non favorables à leur stabilité conformationnelle. Nous devons donc trouver une façon rapide, simple et non destructive pour valider le repliement/conformation des protéines pures avant les essais d'interaction. Une analyse spectroscopique par dichroïsme circulaire a été exécutée dans le but de valider l'état conformationnel des domaines PAS-B purifiés. Les spectres de l'UV lointain (195 – 260 nm) des trois protéines révèlent l'état de leur structure secondaire en solution (figure 3.4). De façon générale, les trois spectres sont similaires avec un spectre caractérisé par deux minima aux environs de 208 et 220 nm. Ce résultat nous indique donc que la structure secondaire des protéines en solution est à prédominance hélicoïdale, avec une certaine contribution des feuillets- $\beta$ . Il est possible de pousser l'analyse plus loin et de récolter des données quantitatives sur la structure secondaire par déconvolution des spectres à l'aide d'un logiciel web libre d'accès, DichroWeb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>) (tableau 3.1). Les résultats de cette estimation reposent sur plusieurs bases de données de structures protéiques obtenues par des techniques de cristallographie et de résonance magnétique nucléaire (Andrade, Chacon et al. 1993). Cette analyse montre une légère prédominance hélicoïdale pour les trois constructions du domaine PAS-B, ce qui est plutôt étonnant en comparaison des structures cristallines présentées à l'annexe D où l'on perçoit une grande proportion de feuillet- $\beta$ .



**Figure 3.4** Analyse par dichroïsme circulaire de la structure secondaire des protéines HIF-2 $\alpha$ , ARNT-Flag et ARNT non étiquetées. Spectre de l'ultraviolet lointain (195 - 260 nm) des solutions protéiques de 10  $\mu$ M pour ARNT-Flag, 15  $\mu$ M pour HIF-2 $\alpha$  et ARNT préparées dans un tampon 10 mM phosphate, 100 mM NaCl pH 7.4. L'acquisition est réalisée en duplicata dans une cuvette en quartz de 1 mm avec une vitesse de balayage de 20 nm/min et une largeur de bande fixée à 1 nm.

**Tableau 3.1** Proportion de structures secondaires des protéines purifiées par déconvolution des spectres de CD.

Protéines (Domaine PAS-B)	Hélice- $\alpha$	feuillet- $\beta$ .
HIF-2 $\alpha$	39%	21%
ARNT-Flag	25%	17%
ARNT	31%	24%

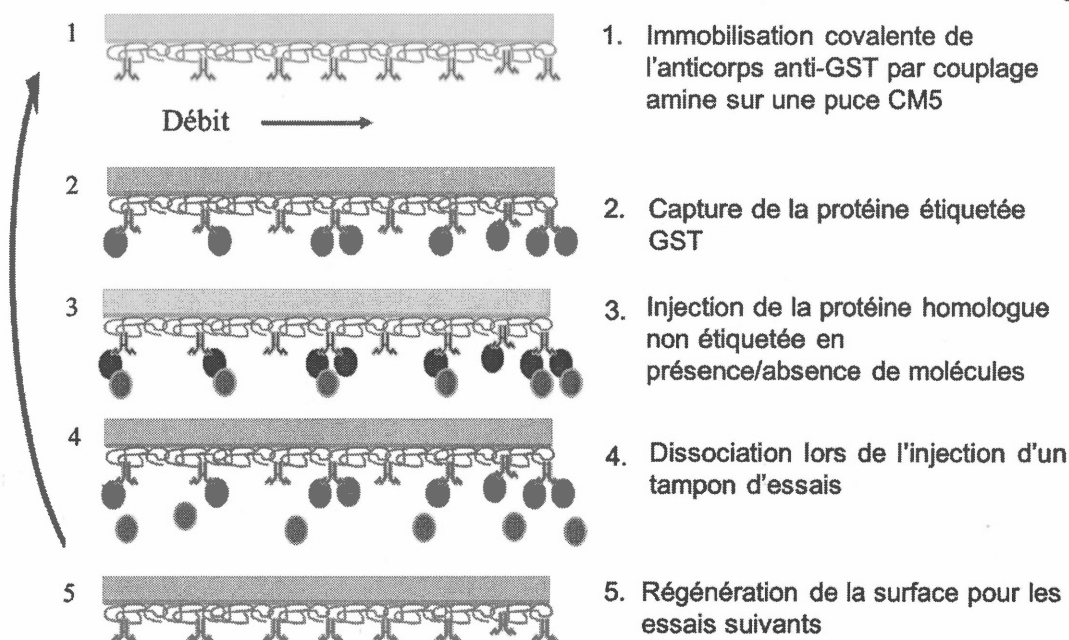
La déconvolution des spectres a été faite par l'analyse K2D sur le site internet libre d'accès de DichroWeb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>).



### 3.4 Analyse de l'hétérodimérisation de HIF-2 $\alpha$ /ARNT par résonance des plasmons de surface

Au terme des différentes procédures exécutées pour l'obtention des protéines recombinantes ainsi que la validation de leur conformation, l'étape suivante consistait à mettre au point une stratégie pour l'évaluation de l'hétérodimérisation des domaines PAS-B de HIF-2 $\alpha$  et ARNT en présence/absence d'inhibiteurs. Dans cette optique, la résonance des plasmons de surface, une technologie développée dans les années 90, est un outil puissant utilisé dans la R&D de nouveaux agents thérapeutiques (Jonsson, Fagerstam et al. 1991). L'instrument Biacore T200 nous permet de réaliser une étude fonctionnelle des interactions entre des facteurs intracellulaires qui couvrent une vaste gamme de biomolécules avec une mesure des paramètres cinétiques en temps réel (Jason-Moller, Murphy et al. 2006). La résonance plasmonique de surface est un phénomène physique permettant de mesurer la liaison d'un analyte à un ligand immobilisé à la surface d'une couche métallique souvent en or ou en argent (Leonard, Hearty et al. 2011). Cette technologie étant polyvalente, plusieurs approches pouvaient être élaborées dans le cadre de l'étude de liaison *in vitro* des domaines PAS-B des HIFs. La stratégie préconisée est schématisée avec les principales étapes à la figure 3.5. Brièvement, le procédé permet une mesure rapide des cinétiques d'association ( $k_{on}$ ) et de dissociations ( $k_{off}$ ). Les données recueillies ont été analysées avec un modèle de liaison (1:1 Langmuir).

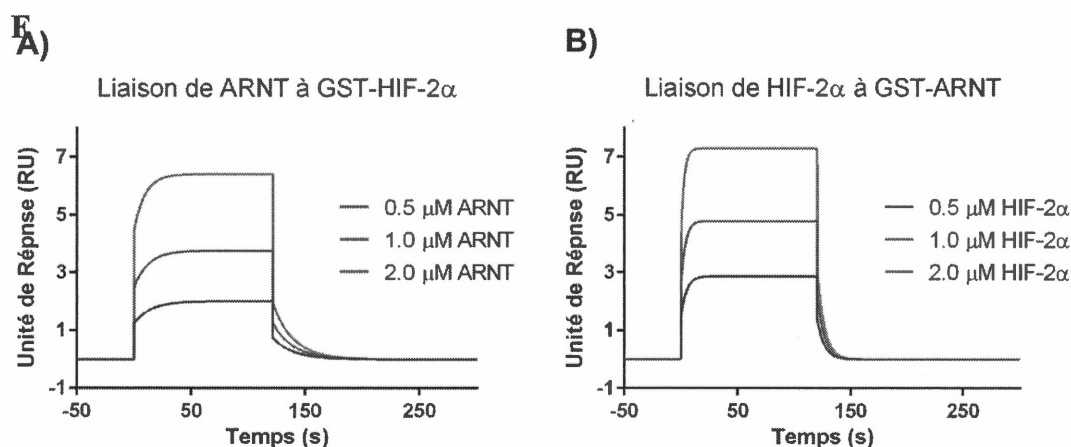




**Figure 3.5 Schématisation de l'approche appliquée à la résonance des plasmons de surface pour l'étude interactionnelle de HIF-2 $\alpha$ /ARNT.** La surface utilisée est une puce CM5 fonctionnalisée avec du dextran carboxyméthylée. Lors de l'étape #3, l'injection de la protéine homologue non étiquetée, un signal croissant est détecté. Lorsqu'il y a injection d'un tampon (étape #4), il y a dissociation du complexe hétérodimérique et un signal décroissant est capté. Finalement, on régénère la surface pour pouvoir initier un autre cycle.

D'abord, nous avons vérifié la liaison des domaines PAS-B sans présence de molécules pour valider l'hétérodimérisation de ces sous-unités. Les résultats présentés à la figure 3.6 montrent l'analyse par SPR de la cinétique de liaison de HIF-2 $\alpha$ /ARNT avec l'une ou l'autre protéine capturée par l'anticorps immobilisé. L'immobilisation de l'anti-GST a permis la capture des protéines GST à un degré raisonnable de 75 RU. Dans les deux cas, on remarque que le signal mesuré est relativement faible et ce malgré de hautes concentrations injectées suite à la capture. On remarque certaines différences sur les courbes cinétiques. En effet, on observe pour la liaison de HIF-2 $\alpha$  à GST-ARNT une courbe qui arrive très rapidement à

saturation des sites de liaisons (équilibre) et une dissociation également très abrupte, contrairement à la liaison de ARNT avec GST-HIF-2 $\alpha$ . Cela peut s'expliquer par la légère différence structurale de ces deux protéines. L'analyse de ces courbes a permis d'évaluer une constante de dissociation ( $K_d$ ) équivalente à  $\sim 850 - 950$  nM, ce qui respecte la valeur théorique de  $\pm 120$   $\mu$ M établie dans la littérature via plusieurs techniques de pointe (Zhu, Martinez-Yamout et al. 2012). Cette interaction relativement faible est cohérente avec la fonction biologique transitoire qu'on attribue à ces protéines.



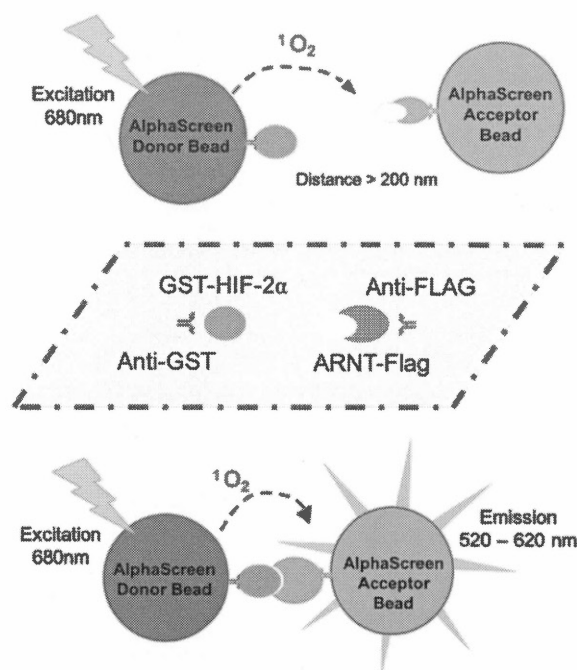
**Analyse par résonance des plasmons de surface de la cinétique d'hétérodimérisation des domaines PAS-B. (A) Liaison de ARNT sur GST-HIF-2 $\alpha$  (B) liaison de HIF-2 $\alpha$  sur GST-ARNT.** Les protéines étiquetées par GST ont été capturées par un anticorps anti-GST immobilisé de façon covalente sur une puce CM5 par couplage amine. Les protéines homologues non étiquetées ont été injectées en duplicatas à des concentrations allant de 0,5  $\mu$ M à 2,0  $\mu$ M dans un tampon PBS 1X, 0,05% Tween-20 pH 7.4 à 25°C. L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel d'évaluation BIA en tenant compte des courbes de référence (non-illustrées) et s'adapte à un modèle de liaison de Langmuir à un seul site.

L'étape subséquente concerne le même essai, mais avec l'ajout de molécules inhibitrices de référence ayant déjà été décrites comme étant antagonistes dans la littérature (Rogers, Bayeh et al. 2013, Scheuermann, Li et al. 2013). Malheureusement, aucune inhibition n'a été distinguée avec les deux molécules de référence utilisées. Dans les faits, ceci n'était pas étonnant puisque de base, le signal mesuré sans molécule était déjà très faible (environ 7 RU) avec une haute concentration de protéines. Donc l'utilisation de molécules à des concentrations de 0,1 à 10  $\mu$ M pour observer un effet inhibiteur sur des concentrations de protéines allant à 2,0  $\mu$ M était incertain.

Pour cette raison, nous avons modifié l'approche méthodologique en immobilisant HIF-2 $\alpha$  non étiqueté de façon covalente directement sur la surface. Cette alternative avait comme objectif de maximiser l'acquisition d'un signal SPR sur la puce en ayant un complexe de liaison à proximité de la surface métallique, en plus d'avoir un niveau d'immobilisation supérieur à celui de la méthode de capture (500 RU). Cependant, le résultat obtenu ne montre aucune amélioration du signal mesuré (annexe E, figure S6). Pour cette raison, l'approche de départ avec l'utilisation d'un anticorps anti-GST était la plus appropriée. D'une part, l'anticorps, lorsqu'il capture la protéine étiquetée l'oriente vers la surface de sorte à ne pas encombrer le site de liaison formant l'hétérodimérisation. En outre, ce procédé permet de faire plusieurs cycles variés sans changer de puce, en utilisant la même immobilisation covalente de l'anticorps pour la capture de l'une ou l'autre des protéines du domaine PAS-B de HIF-2 $\alpha$  et ARNT.

### 3.5 Analyse de l'hétérodimérisation de HIF-2a/ARNT par AlphaScreen™

L'AlphaScreen™ (*Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay Screen*) est une technologie de luminescence qui permet une analyse très sensible. Elle permet de doser et de mesurer des interactions entre molécules sur un principe qui repose sur la proximité physique de deux billes fonctionnalisées, donneuses/accepteuses (figure 3.7). L'un des avantages de cette approche est qu'elle permet d'étudier les interactions moléculaires à petite échelle en microplaque, sans étapes de lavages et avec une extrême sensibilité. Nous avons donc mis au point cet essai, d'abord pour vérifier l'hétérodimérisation des domaines PAS-B capturés par les billes greffées d'un anticorps correspondant, avant de passer à la validation à l'aide de composés de référence et au criblage de la nouvelle génération en développement.



**Figure 3.7 Schématisation de l'approche de l'AlphaScreen™ appliquée au modèle interactionnel des domaines PAS-B de HIF-2α et ARNT.** Lorsque le donneur (billes bleues), qui contient de la phtalocyanine, est excité par un laser (à 680 nm), l'oxygène ambiant est converti en singlet d'oxygène. Une réaction très amplifiée générant plus de 60 000 molécules d'oxygène qui peuvent parcourir au moins 200 nm en solution aqueuse avant la désintégration. Par conséquent, si les billes du donneur et de l'accepteur (perles orange) se trouvent dans cette proximité, le transfert d'énergie se produit. Les molécules du singlet d'oxygène réagissent avec des produits chimiques dans les perles accepteurs pour produire une réponse luminescente.

Le tableau 3.2 expose le résultat de l'interaction des domaines PAS-B de HIF-2α et ARNT mesurée par l'AlphaScreen™ à des concentrations allant de 300 à 10 nM. Le signal résultant de cette interaction à de faibles concentrations protéiques témoigne

de la sensibilité de cette technique. Avec l'établissement d'une matrice en 2D de concentrations décroissantes, on remarque que le signal mesuré provient bel et bien de l'interaction biologique des perles et qu'il est environ 12 fois plus élevé que le signal basal (annexe F, tableau S1). Cependant, il est à noter que ARNT-Flag semble causer un signal basal excédentaire d'un facteur 2, en absence de GST-HIF-2 $\alpha$  (annexe F, tableau S2). Hypothétiquement, ce signal non spécifique s'explique par une présence possible de traces de GST-ARNT-Flag dans la solution d'ARNT-Flag purifiée par exclusion stérique. Donc, les protéines GST-ARNT-Flag sont captées à la fois par la bille donneuse (anti-GST) et la bille accepteuse (anti-Flag), ce qui engendre un signal faux positif. Par contre, il faut souligner que ce signal est faible grâce à l'exécution d'une double purification par l'entremise d'une colonne de chromatographie d'affinité GSTrap pour l'élimination des traces de protéines non clivées ayant l'étiquette GST.

**Tableau 3.2 Signal de l'hétérodimérisation de HIF-2 $\alpha$ /ARNT par AlphaScreen™ en fonction de la concentration protéique.**

		[ARNT-Flag] nM				
		300	100	30	10	0
[GST-HIF2 $\alpha$ ] nM	300	16591	11396	5321	2384	1342
	100	11177	7667	4173	2271	1265
	30	7700	5304	3368	2021	1353
	10	3034	4119	2969	1898	1361
	0	2437	3431	2547	1927	1391

Note : Les essais ont été réalisés en duplicatas sur plaque blanche de 96 puits et mesurés avec un spectromètre Infinite® M1000 PRO (TECAN) en utilisant la fonction programmée pour les tests d'AlphaScreen™/AlphaLISA™.

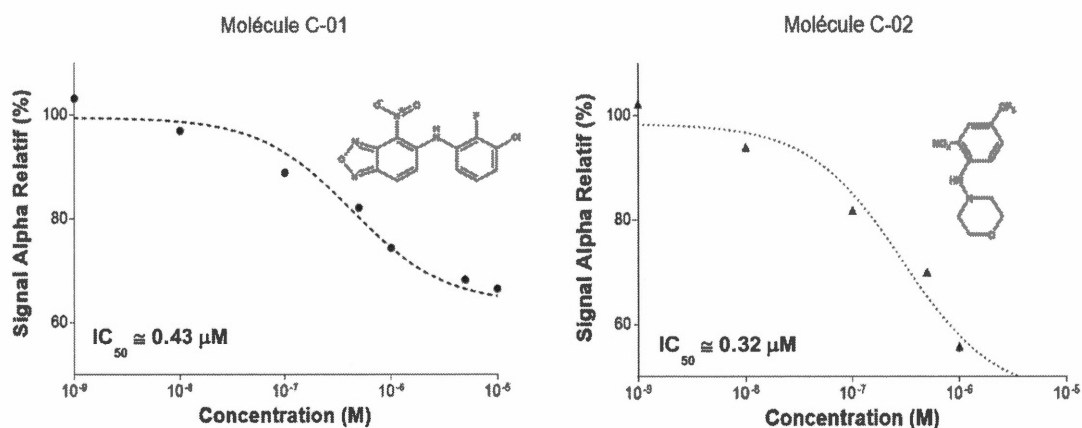


### 3.6 Essais de criblage d'inhibiteurs de l'hétérodimérisation HIF-2 $\alpha$ /ARNT par AlphaScreen™

Pour entamer nos essais de criblage par l'AlphaScreen™, nous disposions de deux molécules inhibitrices de référence ayant déjà été caractérisées par le groupe de Scheuermann par RMN et ITC (Rogers, Bayeh et al. 2013, Scheuermann, Li et al. 2013). Ces molécules sont antagonistes de l'hétérodimérisation de HIF-2 $\alpha$ /ARNT *in vitro*, mais ne présentent pas d'intérêt pour le développement médicamenteux, puisqu'elles sont impraticables sur un modèle cellulaire (*in vivo*). Cela explique la pertinence de notre étude qui, rappelons-le, vise à mettre en place une méthode de criblage rapide en amont de la R&D pour épauler des modèles *in silico* et ainsi devenir un outil de base dans le domaine du développement d'inhibiteur d'IPP. Pour cela, les molécules C-01 et C-02 ont été incorporées à l'essai optimisé en microplaque, tel qu'exposé dans le tableau 3.2. Concrètement, celles-ci ont été incubées trente minutes avec GST-HIF-2 $\alpha$  avant d'être ajoutées à ARNT. Un temps d'équilibre s'en suit avant l'ajout des billes et un second temps d'équilibre est opéré avant la mesure finale sur le spectrofluorimètre.

Les résultats sont satisfaisants, considérant les IC<sub>50</sub> obtenues par les courbes du signal relatif d'AlphaScreen™. En effet, d'après l'ajustement de la courbe de régression sigmoïdale, le signal relatif d'AlphaScreen tend à diminuer avec l'augmentation de la concentration des agents inhibiteurs C-01 et C-02. L'affinité pour le domaine PAS-B de HIF-2 $\alpha$  de ces deux molécules de référence est connue, avec un K<sub>D</sub> qui se situe entre 1 et 2  $\mu$ M (Scheuermann, Li et al. 2013). Ce qui peut expliquer leur bon caractère antagoniste pour l'interaction des domaines PAS-B, avec des IC<sub>50</sub> comparables aux données de la littérature, dans le bas  $\mu$ M (C-01  $\approx$  0,43  $\mu$ M et C-02  $\approx$  0,32  $\mu$ M) (Scheuermann, Tomchick et al. 2009, Scheuermann, Li et al. 2013, Guo, Scheuermann et al. 2015). Ces résultats permettent la validation

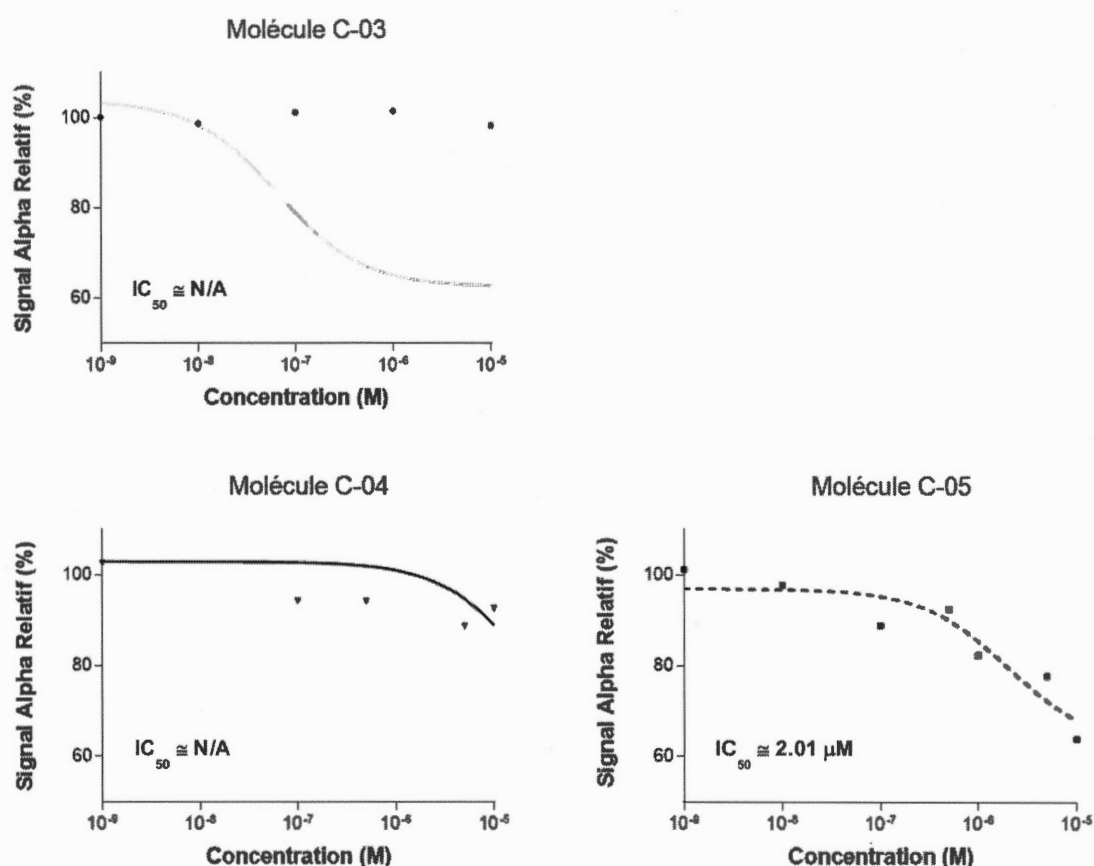
des essais d'AlphaScreen, puisque les données obtenues par les molécules de référence correspondent à celles obtenues par le groupe de Gardner et Buick (Rogers, Bayeh et al. 2013).



**Figure 3.8 Essais AlphaScreen™ d'inhibition par deux molécules de références.** Des concentrations allant de 0,1 à 10  $\mu M$  d'agents inhibiteurs connus et déjà caractérisés. Les molécules ont été incorporées dans l'essai optimisé de l'hétérodimérisation des domaines PAS-B de HIF-2 $\alpha$ /ARNT. Les molécules ont été incubées avec HIF-2 $\alpha$  pendant 30 min avant l'ajout de ARNT. Les courbes du signal relatif d'AlphaScreen™ ont été rapportées par une courbe sigmoïdale avec laquelle nous avons déterminé les  $IC_{50}$ .

En ce qui concerne les essais effectués avec les molécules de la seconde génération en développement, nous avons procédé au criblage de trois molécules (C-03, C-04 et C-05), sans connaître leur structure. Les molécules C-03 et C-04 ne semblent aucunement avoir un potentiel antagoniste pour l'interaction des domaines PAS-B, d'après le signal relatif d'AlphaScreen qui ne diminue pas en présence de concentrations élevées de ces agents. Il serait intéressant de réaliser des tests d'ITC

pour évaluer si ce défaut est justifié par une faible affinité pour le domaine PAS-B de HIF-2 $\alpha$ . Ensuite, la molécule C-05 ayant un  $IC_{50} \approx 2,01 \mu M$ , est inhibitrice, mais moins efficace que ce que nous avons observé avec les molécule C-01 et C-02. Ces essais ne sont que des exemples pour montrer la faisabilité de la technique d'AlphaScreen™ pour le modèle étudié dans ce cas-ci.



**Figure 3.9 Essais AlphaScreen™ d'inhibition par des molécules de seconde génération en développement.** Des concentrations allant de 0,1 à 10  $\mu M$  d'agents inhibiteurs connus et déjà caractérisés. Les molécules ont été incorporées dans l'essai optimisé de l'hétérodimérisation des domaines PAS-B de HIF-2 $\alpha$ /ARNT. Les molécules ont été incubées avec HIF-2 $\alpha$  pendant 30 min avant l'ajout de ARNT. Les courbes du signal relatif d'AlphaScreen™ ont été rapportées par une courbe sigmoïdale avec laquelle nous avons déterminé les  $IC_{50}$ .

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Encore aujourd'hui, le nombre de personnes atteintes de cancer ne cesse d'augmenter, en prenant du terrain sur les quatre coins du globe. Ce fléau ravageur se répand dans tous les pays, touchant autant les enfants, les adultes et les personnes âgées sans qu'il y ait de distinction entre les classes sociales. Bien que la recherche dans ce domaine ait redoublé d'ardeur, les avenues thérapeutiques efficaces se font toujours peu probantes et rares (Bastien, McNeill et al. 2015). À juste titre, selon la gravité du cancer, il existe actuellement différents traitements prescrits. Par exemple, les chimiothérapies, les radiothérapies ou encore une ablation de la tumeur qui est, sans aucun doute, l'approche la plus agressive. D'autres sous-domaines de traitements ont vu le jour depuis, et plus les mystères des mécanismes de voies de signalisation se clarifient, plus le potentiel d'une nouvelle classe de traitements moins agressifs semble être plausible.

De nombreuses études ont permis d'élucider comment les cellules cancéreuses et les cellules souches cancéreuses peuvent survivre et progresser dans un foyer tumoral hypoxique. Avec cette meilleure compréhension mécanistique de la régulation des cellules cancéreuses face au stress, des traitements ciblés voient le jour dans le domaine de la médecine personnalisée. Concrètement, ces médicaments ciblent les biomarqueurs, telles que les protéines qui sont les acteurs principaux de la

transduction de signaux, responsables de la progression et de la propagation des cellules cancéreuses. En ciblant de façon sélective des IPPs par des molécules chimiques, il serait possible d'interrompre la croissance et la propagation des cellules tumorales en perturbant une ou plusieurs voies de signalisation.

Historiquement, suite aux travaux de Judah Folkman portant sur les tumeurs solides, l'angiogenèse a été au cœur d'un véritable engouement pour la mise en place d'une thérapie anti-angiogénique. En effet, la croissance des tumeurs dépend de leur capacité à stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Les VEGF/VEGFR sont des acteurs très importants pour l'angiogenèse et constituent une cible très intéressante pour le traitement des tumeurs solides. Ainsi, on a vu l'apparition des anticorps monoclonaux dirigés contre les facteurs de croissance pro-angiogéniques et leurs récepteurs ou encore les inhibiteurs des tyrosines kinases associées au récepteur du VEGF. Plus récemment, les facteurs inductibles par l'hypoxie sont devenus une cible attrayante pour bloquer l'angiogenèse à des fins thérapeutiques.

L'hypoxie est un stress qui se présente au sein des tumeurs solides dans un foyer à faible teneur en oxygène. Dès lors, la régulation des HIFs coordonne l'adaptation cellulaire face à une telle agression en soutenant la progression rapide des tumeurs. Le facteur inductible par l'hypoxie HIF-2 $\alpha$  s'hétérodimérise avec ARNT pour moduler la réponse adaptatrice à cette baisse d'oxygène. C'est pourquoi, l'identification d'inhibiteurs puissants, sélectifs et non toxiques de l'hétérodimérisation de HIF présente un grand intérêt. Alors que certains composés ont récemment été identifiés comme inhibiteurs du complexe HIF-2 $\alpha$ /ARNT, ces inhibiteurs manquent d'efficacité et présentent des fonctionnalités chimiques, tel que des groupements anilines, aldéhydes, nitros et les halogénures benzyliques, associés à des risques pour la viabilité cellulaire. Pour remédier à ces risques et identifier des candidats pharmaceutiques de plus haute qualité, une approche de

criblage d'inhibiteurs doit être mise en place. La combinaison d'informations clés relatif à l'interaction HIF-2 $\alpha$ /ARNT par le biais de leur domaine PAS-B respectif, en présence d'inhibiteurs, accélèrera le processus du développement d'agents thérapeutiques. Ultimement cette stratégie permettra d'obtenir de nouvelles approches dans la conception rationnelle de nouveaux inhibiteurs d'interaction protéine-protéine.

C'est dans cette optique, que nous avons mis en place une plateforme de criblage d'inhibiteurs de l'hétérodimérisation de HIF-2 $\alpha$ /ARNT. Qui plus est, les IPPs médiées par le domaine PAS sont analogues à de nombreux systèmes et peuvent être régulées par une modification conformationnelle allostérique induite par la liaison de cofacteurs, au sein du domaine lui-même. Ceci rend notre étude d'autant plus intéressante puisqu'elle servira de base multivalente à plusieurs modèles biologiques qui convergent vers une seule et même intention, l'identification d'agents thérapeutiques ciblés. En combinant des méthodes *in silico* reposant sur des bases informatiques avec une plateforme de criblage d'agents inhibiteurs *in vitro*, la R&D sera mieux épaulée en amont du processus de recherche en voie de sélection de molécules potentiellement médicamenteuses.

La première démarche pour mener à bien le développement d'essais de criblage consistait à la production du matériel protéique par l'entremise d'un modèle bactérien d'*Escherichia coli* BL21 (DE3). Nous avons conçu trois constructions plasmidiques renfermant le domaine PAS-B de HIF-2 $\alpha$  et ARNT ayant en commun l'étiquette GST afin d'exécuter une purification par chromatographie d'affinité. Les résultats présentés aux figures 3.1 - 3.3 montrent le processus de purification. L'expression et la purification ont été mis au point en évitant les problèmes couramment rencontrés tel que l'incorporation de la protéine d'intérêt dans les corps d'inclusion, un clivage endogène important ou encore l'agrégation hâtive des protéines purifiées en solution. Le processus de purification avait un rendement



variant entre 5 à 8 mg de protéines étiquetées par litre de culture bactérienne. Il n'en demeure pas moins qu'en ce qui concerne la purification des protéines clivées par la thrombine, une optimisation du procédé pouvait être apportée, puisqu'on parvenait à peine à récupérer 50% de la fraction clivée. Ceci peut être rectifié en augmentant la quantité de thrombine en solution, ainsi que le temps d'incubation puisqu'à priori les protéines en solution maintiennent une conformation adéquate (figure 3.4). Dans l'ensemble, nos stratégies d'expression et de purification ont permis d'opérer avec efficacité pour mettre en place les essais biophysiques.

Une fois que les protéines d'intérêt ont été obtenues, nous avons validé que celles-ci étaient bien repliées. Cette question devait être traitée avant l'élaboration des premiers essais biophysiques pour éviter les mauvaises interprétations des analyses interactionnelles entre les domaines PAS-B de HIF-2 $\alpha$  et ARNT. La spectroscopie CD en UV-lointain était la méthode la mieux adaptée pour notre expérimentation. Celle-ci présente plusieurs avantages : technique rapide, non destructive et nécessitant peu de matériel protéique. Les résultats ont révélé des spectres à prédominance hélicoïdale pour les trois variantes protéiques du domaine PAS-B sans étiquette GST. En effet, nous avons facilement distingué les deux minima à 208 et 222 nm pour les trois spectres illustrés à la figure 3.4. De plus, la déconvolution des spectres par une analyse de K2D allait dans le même sens, puisque l'estimation de la proportion des structures secondaires favorisait essentiellement une structure en hélice- $\alpha$ , plutôt que le feuillet- $\beta$ . Cette analyse a été choisie au détriment des autres programmes (Selcon3, Contin, Varslc, CDSSTR) car la base de données qui la supporte comporte une quarantaine de structures protéiques très bien caractérisées par RMN et cristallographie (Andrade, Chacon et al. 1993). Son intervalle d'analyse de spectres se situe entre 200 et 240 nm, ce qui coïncide avec les signaux caractéristiques des structures secondaires en hélice- $\alpha$  (208 – 222 nm) et feuillet- $\beta$  (218 nm). Dans tous les cas, il faut souligner que le signal CD des protéines en solution dévoilé par les spectres d'UV-lointain a

tendance à surévaluer la structure en hélice- $\alpha$  (Ranjbar and Gill 2009). C'est pour cette raison que lorsqu'on observe les structures cristallines, il ne semble pas y avoir une conformation prédominante en hélice- $\alpha$ , mais plutôt une balance équitable entre la structure hélicoïdale et en feuillet- $\beta$ . Cependant, l'objectif de cette approche n'était pas la détermination des proportions des structures secondaires, mais plutôt la validation du bon repliement des protéines en solution. Nos résultats montrent que les protéines purifiées après clivage ne sont ni agrégées, ni dénaturées.

Lorsqu'on désire examiner l'impact d'inhibiteurs sur une IPP, il est nécessaire d'avoir au préalable un point de repère quant à la liaison basale de l'hétérodimère. Dans cette optique, nous avons décidé d'utiliser la résonance des plasmons de surface pour évaluer la cinétique de l'hétérodimérisation de HIF-2 $\alpha$ /ARNT par le biais des constantes de liaison et de dissociation. Nous avons préconisé l'utilisation d'une micropuce de dextran carboxyméthylée CM5 pour sa polyvalence, en termes de gamme de macromolécules compatibles. Cette versatilité est fortement appréciée, puisque qu'elle nous permet de procéder par deux approches différentes.

En sachant que nos protéines contenaient une étiquette GST, nous avons effectué une capture sur la surface de la micropuce via l'immobilisation covalente d'un anti-GST, au lieu d'immobiliser de façon covalente l'un ou l'autre des domaines PAS-B homologues. Cette stratégie a l'avantage d'être plus économique en termes de matériel protéique, puisqu'une fois l'anticorps anti-GST immobilisé, il nous permet de faire la capture de GST-HIF-2 $\alpha$  ou GST-ARNT, tout en alternant après lavage. Ceci dit, l'avantage le plus intéressant est le fait que la capture des protéines se fait sans modification chimique, en plus d'orienter la protéine à la surface de la puce métallique. Néanmoins, les résultats obtenus étaient décevants au niveau de la puissance du signal mesuré, qui rappelons-le, était très faible avec seulement 7 RU atteint. Ce faible signal peut s'expliquer par un complexe de liaison protéique (Anti-GST/GST-HIF-2 $\alpha$ /ARNT) qui se trouve éloigné de l'interface, abaissant ainsi la

force du signal mesuré. Nous avons tenté d'y remédier en tentant l'approche d'immobilisation covalente de HIF-2 $\alpha$ , malgré les inconvénients à l'égard de la structure chimiquement modifiée par une liaison covalente. Celle-ci a été réalisée en vue d'augmenter la masse immobilisée de HIF-2 $\alpha$ , et par le fait même, les sites de liaison pour ARNT. Malheureusement, aucune amélioration n'a été constatée, comme peut en témoigner la figure S5. Néanmoins, nous avons tenu à réaliser des essais en présence d'inhibiteurs de référence, tel que le composé C-01. Toutefois, aucune inhibition claire n'a pu être discernée (figure S6). D'autre part, un autre aspect très important avait un impact considérable; il s'agit de l'insolubilité des composés chimiques en milieu aqueux. Bien que ces composés hydrophobes aient été solubilisés préalablement dans le DMSO avant d'être incorporé dans le tampon d'essai, il est difficile de garantir la solubilité des composés en solution. Pour valider la liaison des composés chimiques au domaine PAS-B, il aurait été intéressant d'effectuer des tests par titration calorimétrique isotherme (ITC). L'ITC est une technique capable de déterminer simultanément tous les paramètres de liaison en une seule expérience. Elle ne nécessite aucune modification des partenaires protéiques impliqués dans la liaison ou encore une immobilisation. L'analyse thermodynamique de la liaison des composés au domaine PAS-B de HIF-2 $\alpha$  aurait été un atout majeur dans la mise en place de nos essais de criblage en accélérant l'identification des candidats à préconiser.

Devant ce manque de réussite pour le criblage d'inhibiteurs avec la résonance des plasmons de surface, nous avons décidé d'entamer rapidement les essais par AlphaScreen™. Cette technologie repose sur le principe de perles donneuses (photosensibles) et acceptuses (chimiluminescentes). Ces perles sont recouvertes de groupes fonctionnels différents qui permettent une bioconjugation orthogonale sur mesure avec des analytes d'intérêt. Lorsqu'une interaction biomoléculaire rapproche les billes donneuses (< 200 nm), l'excitation des billes donneuses à 680 nm provoque la libération de molécules d'oxygène qui déclenchent une cascade de

transfert d'énergie à la perle accepteuse qui émet alors une fluorescence entre 520 – 620 nm. La sensibilité de cette analyse découle de la très faible fluorescence de fond (Ullman, Kirakossian et al. 1994). L'acquisition d'un fort signal combiné avec de faible niveau de bruit de fond (signal non spécifique), conduit à des rapports *Signal/Background* de plusieurs dizaines et ce avec de très faibles concentrations protéiques (annexe F, tableau S2). Si on compare avec le SPR, non seulement le signal en RU était faible, mais les concentrations appliquées étaient 7 fois supérieures à celles de l'AlphaScreen. La raison qui explique cette disparité, quant à la qualité des mesures effectuées, est possiblement la grande avidité des perles d'AlphaScreen™ permettant d'analyser des interactions relativement faibles dans des conditions d'équilibre sans procédures de lavage. Une autre caractéristique unique de l'AlphaScreen™ est la miniaturisation de l'analyse, ce qui la rend applicable aux ligands difficiles à obtenir en grande quantité et au criblage à haut débit.

Globalement, l'optimisation de notre essai d'AlphaScreen™ d'hétérodimérisation des domaines PAS-B a été concluante. Le seul point à modifier serait au niveau de l'utilisation d'étiquettes de purification distinctes pour les protéines d'intérêt. Dans notre cas, nous avons utilisé l'étiquette GST pour les deux constructions du domaine PAS-B. Or, la perle donneuse conjuguée avec l'anti-GST pouvait capturer non seulement le GST-HIF-2 $\alpha$ , mais également les traces résiduelles de GST-ARNT-Flag non éliminées par la double purification. Cela explique le signal de bruit de fond mesuré en l'absence de GST-HIF-2 $\alpha$ , qui était supérieur d'un facteur 2 par rapport au signal en absence d'ARNT-Flag (tableau S2). Par exemple, dans ce cas-ci, il aurait été préférable d'utiliser une étiquette 6xHis-Tag pour la purification du domaine PAS-B d'ARNT-Flag. Sans compter que cela nous aurait évité l'étape de clivage, en prenant de façon intégrale la protéine 6xHis-ARNT-Flag, puisque la petite étiquette 6xHis est beaucoup trop petite pour affecter la liaison des deux domaines PAS-B.



Les résultats obtenus par cette approche pour les molécules de référence sont comparables à ceux de la littérature. À cet égard, les études ayant caractérisées les molécules C-01 et C-02 par AlphaScreen™ ont obtenu des IC<sub>50</sub> légèrement plus faibles, autour de 0,1 µM, mais cette différence peut être engendré par des paramètres. Dans l'ensemble, cette mesure réalisée avec les molécules de référence nous sert de point de repère pour notre plateforme d'AlphaScreen™. On a constaté que parmi les trois composés de la seconde génération, un seul affiche un potentiel inhibiteur de l'hétérodimérisation des domaines PAS-B.

Cette approche rapide, efficace et polyvalente serait d'un grand intérêt dans le développement de thérapies moléculaires ciblées. En outre, elle peut être combinée à un système robotisé. Ainsi, nous aurions une plateforme de criblage à haut débit, permettant l'identification d'agents thérapeutiques ciblant les IPPs. En somme, nous avons fait la démonstration de la faisabilité d'une approche qui se démarque de par sa sensibilité, sa rapidité et sa simplicité pour l'analyse d'IPP. On peut donc dire, qu'à l'avenir, lorsqu'on tente de faire des études d'interaction de biomolécules, les approches biophysiques sont des outils à privilégier davantage pour renforcer les méthodes biochimiques et/ou bio-informatiques dans le domaine de la R&D.

## CHAPITRE V

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour conclure, le projet de recherche présenté dans ce mémoire avait pour but de développer une plateforme d'essai de criblage d'inhibiteurs d'IPP, en ayant comme modèle les domaines PAS-B de facteurs inductibles par l'hypoxie, HIF-2 $\alpha$  et ARNT. Nous avons effectué une production des protéines d'intérêts via un modèle recombinant bactérien d'*E. coli*. BL21 (DE3). Une fois l'intégrité structurelle des protéines purifiées vérifiées par spectroscopie de CD, une analyse de l'hétérodimérisation de HIF-2 $\alpha$ /ARNT a été exécutée par SPR. Ainsi, nous avons pu comparer et valider les constantes de dissociation de ce complexe avec les données d'autres groupes de recherche. Le criblage d'inhibiteurs de référence n'a pas été concluant par le SPR, comme l'a montré l'exemple à la figure S6. Il serait pertinent d'optimiser ces essais en travaillant avec des concentrations protéiques inférieures à 1  $\mu$ M, tout en cherchant à avoir une meilleure acquisition de signal en RU. Cela nous permettrait peut-être de mieux évaluer l'effet antagoniste des molécules par le SPR. En revanche, le criblage par AlphaScreen™ a été probant. Il nous a permis d'obtenir des IC<sub>50</sub> très convaincantes pour les deux molécules de références testées. Cela a confirmé la faisabilité de cette méthode rapide de criblage, en prenant comme exemple trois molécules de la nouvelle génération qu'on tente de développer en R&D.

Prochainement, cette technique d'AlphaScreen™ sera adaptée pour être accomplie de manière robotisée avec la plateforme TECAN et cela nous permettra d'accomplir un criblage à haut débit d'une centaine de molécules nouvelles. Cette mise en place, est



favorable pour l'industrie pharmaceutique lorsqu'elle est utilisée en amont du processus de développement de médicaments.

De plus, il est important de considérer l'utilisation de cette méthode pour l'étude des IPPs dans un autre cadre que pour le développement d'agents pharmacophores. Par exemple, les techniques utilisées pour investiguer l'interaction entre protéines par co-immunoprécipitation ou par microscopie confocale ne nous permettent pas de mesurer quantitativement la force de ces interactions. Le SPR ou l'AlphaScreen™ sont des technologies de pointe qui ajoutent une puissance aux données de type biochimique pour venir supporter ou renforcer les conclusions tirées sur une analyse par gel SDS-PAGE ou encore par co-localisation au microscope.

## ANNEXE A

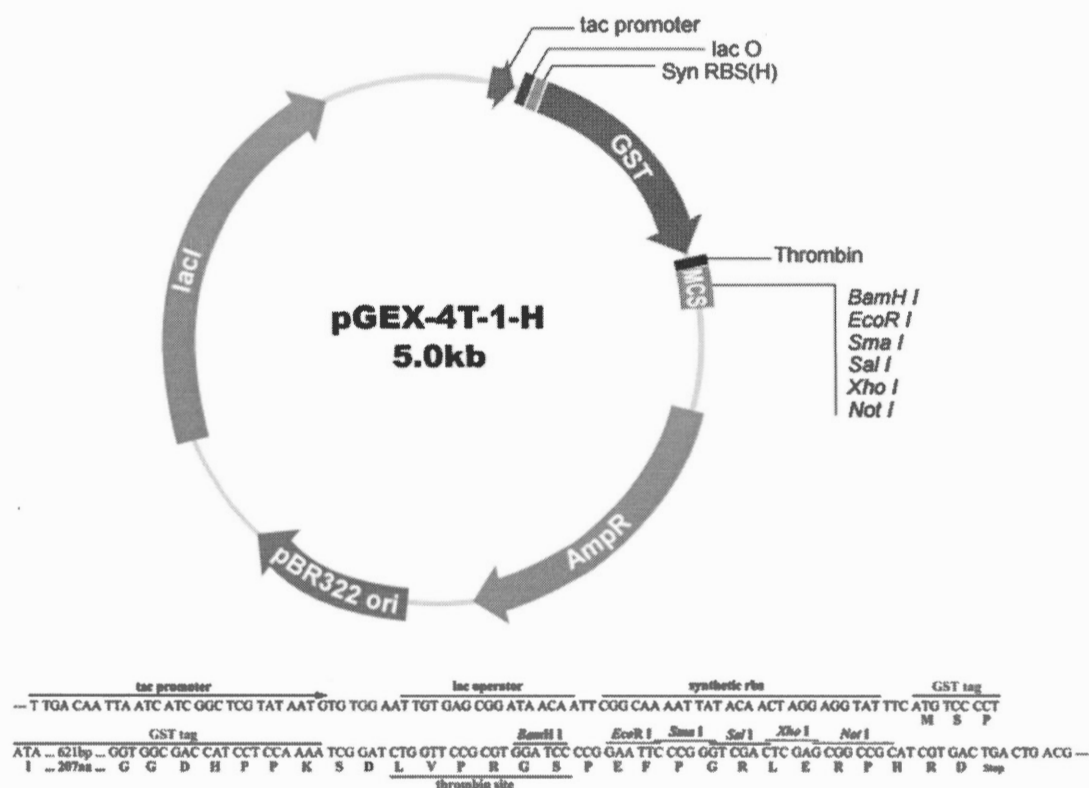


Figure S1. Cartographie du vecteur plasmidique pGEX-4T-1 ayant servi pour les 3 constructions utilisées. Cette carte montre les sites *BamH I* et *Sal I* ayant servis aux enzymes de restriction pour l'insertion des gènes codants des protéines, mais également le site de clivage de la thrombine avec les détails concernant la séquence en acides aminés (GenScript, USA).

## ANNEXE B

### R247E-HIF-2 $\alpha$ (240-350)

<sup>240</sup>D SKTFLSEHSM DMKFTYCDDR ITELIGYHPE ELLGRSAYEF  
YHALDSENMT KSHQNLCTKG QVVSGQYRML AKHGGYVWLE  
TQGTVIYNPR NLQPQCIMCV NYVLSEIEKN<sup>350</sup>

### E362R ARNT (355-470)

<sup>356</sup>NVCQP TRFISRHNIE GIFTFVDHRC VATVGYQPQE LLGKNIVEFC  
HPEDQQLLRD SFQQVVKLKG QVLSVMFRFR SKNQEWLWMR  
TSSFTFQNPY SDEIEYIICT NTNPKNSSQE<sup>470</sup>

### GST

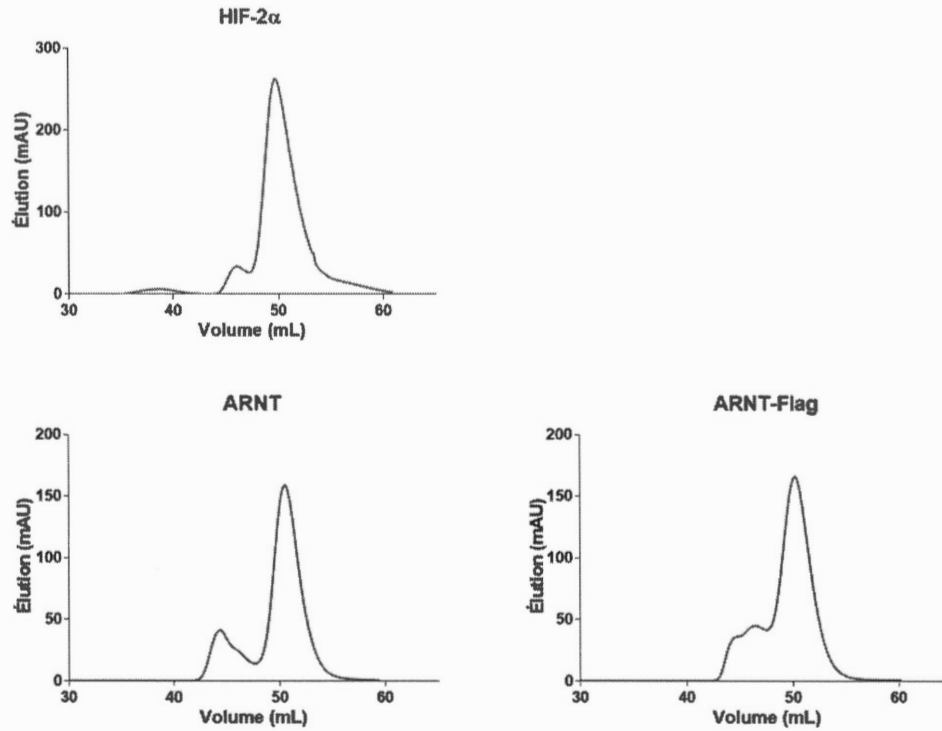
<sup>1</sup> MPMILGYWDI	RGLAHAIRLL	LEYTDSSYEE	KKYTMGDAPD
YDRSQWLNEK	FKLGLDFPNL	PYLIDGAHKI	TQSNAILCYI
ARKHNLCGET	EEEKIRVDIL	ENQTMDNHMQ	LGMICYNPEF
EKLKPKYLEE	LPEKLYSE	FLGKRPWFAG	NKITFVDFLV
YDVLDLHRIF	EPKCLDAFPN	LKDFISRFEG	LEKISAYMKS
SRFLPRPVFS	KMAVWGNK <sup>218</sup>		

### FLAG

<sup>1</sup>DYKDDDDK<sup>8</sup>

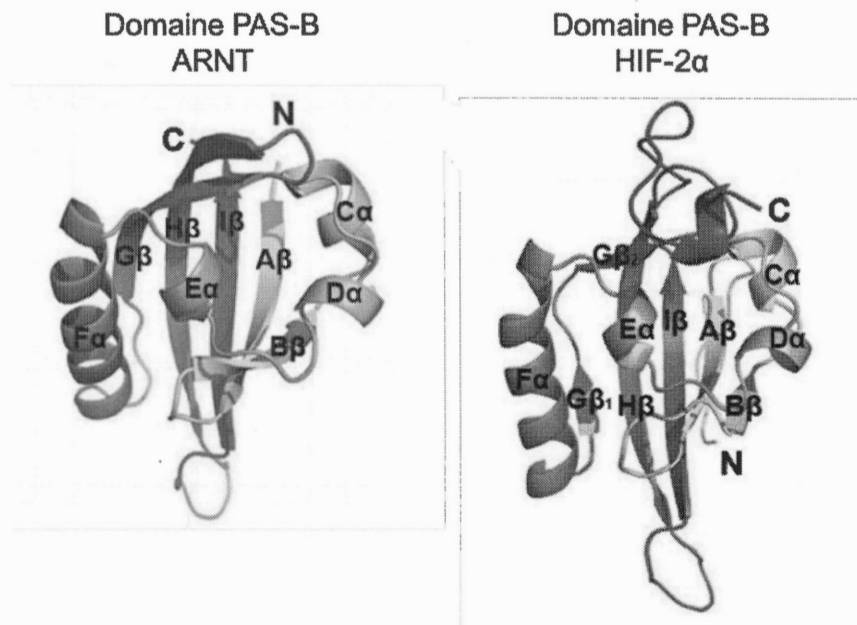
**Figure S2. Les séquences en acides aminés des domaines PAS-B de HIF-2 $\alpha$ , ARNT, ainsi que les étiquettes de purification GST et FLAG.**

## ANNEXE C



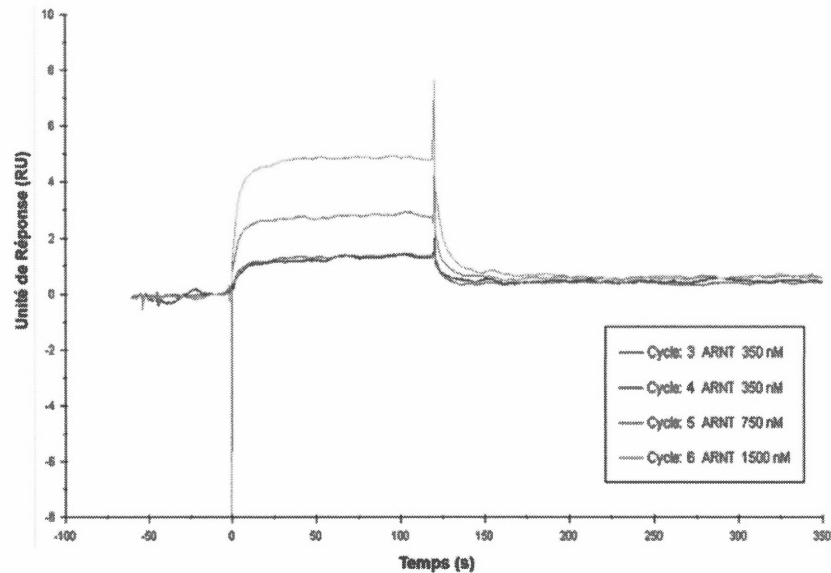
**Figure S3** Graphique des chromatographies d'exclusion stérique des différentes protéines purifiées après clivage de l'étiquette GST. Suite aux éluions, les fractions les plus concentrées ont été injectées dans le système ÄKTA pure pour la réalisation de l'exclusion stérique (voir section Matériel et Méthodes). Les courbes suivantes correspondent aux mesures en mAu à une longueur d'onde de 230 nm.

## ANNEXE D



**Figure S4. Structure secondaire des domaines PAS-B de ARNT et HIF-2 $\alpha$ .** La structure secondaire des domaines PAS-B a été obtenue par cristallographie et annotée de façon sectionnée par des lettres grecs. Adaptée de (Wu, Potluri et al. 2015)

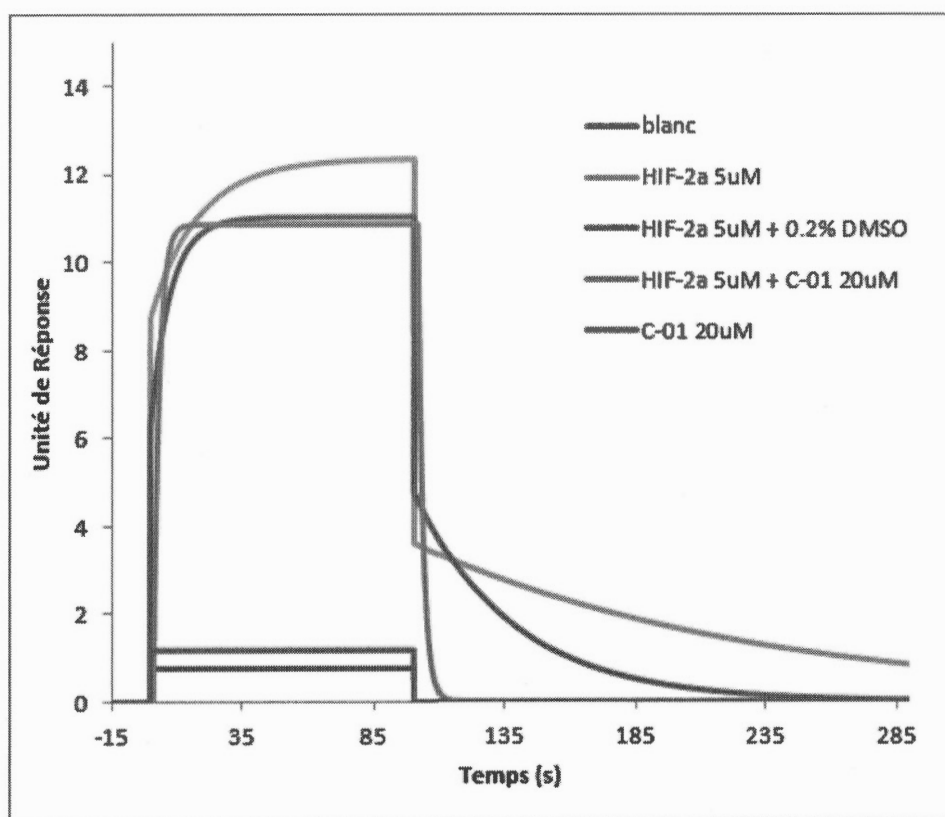
## ANNEXE E



**Figure S5. Analyse par SPR de l'hétérodimérisation des domaines PAS-B par immobilisation covalente de HIF-2 $\alpha$ .** Liaison de de ARNT sur son homologue HIF-2 $\alpha$  immobilisé de façon covalente par couplage amine sur une puce. Les protéines ARNT non étiquetées ont été injectées en duplicatas à des concentrations allant de 0,35  $\mu$ M à 1,5  $\mu$ M dans un tampon PBS 1X, 0,05% Tween-20 pH 7.4 à 25°C. Les données brutes ont été observées à l'aide du logiciel d'évaluation BIA en tenant compte des courbes de références (non-illustrées) et n'ont pas été adaptées à un modèle de liaison de Langmuir à un seul site.



## ANNEXE E



**Figure S6. Analyse par SPR de l'hétérodimérisation des domaines PAS-B en présence d'un inhibiteur de référence C-01.** Liaison de de HIF-2 $\alpha$  sur son homologue GST-ARNT capturé par l'anti-GST immobilisé sur une puce. Les protéines HIF-2 $\alpha$  (5  $\mu$ M) non étiquetées en présence et absence de C-01 (20  $\mu$ M) ont été injectées en duplicatas dans un tampon PBS 1X, 0,05% Tween-20 pH 7.4 à 25°C. Les données brutes ont été observées à l'aide du logiciel d'évaluation BIA en tenant compte des courbes de références (non-illustrées) et n'ont pas été adaptées à un modèle de liaison de Langmuir à un seul site.

## ANNEXE F

**Tableau S1 AlphaScreen™ Signal du contrôle positif performé avec le tampon d'essai vs les Omnibeads (Contrôle).**

	Tampon	Omnibeads
Réplicas	486	280132
	626	284247
	550	289311
	646	290253
Moyenne	577	285986

Note : Les essais ont été réalisés sur plaque blanche de 96 puits et mesurés avec un spectromètre Infinite® M1000 PRO (TECAN)

**Tableau S2 Rapport du signal brute d'AlphaScreen™ sur le signal de bruit de fond de l'hétérodimérisation des domaines PAS-B de HIF-2 $\alpha$ /ARNT.**

		[ARNT-FLAG] nM				
		300	100	30	10	0
[GST-HIF2 $\alpha$ ] nM	300	11.9	8.2	3.8	1.7	1.0
	100	8.0	5.5	3.0	1.6	0.9
	30	5.5	3.8	2.4	1.5	1.0
	10	2.2	3.0	2.1	1.3	1.0
	0	1.8	2.5	1.8	1.4	1.0

## BIBLIOGRAPHIE

- Andrade, M. A., P. Chacon, J. J. Merelo and F. Moran (1993). "Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network." Protein Eng **6**(4): 383-390.
- Arkin, M. R. and J. A. Wells (2004). "Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream." Nat Rev Drug Discov **3**(4): 301-317.
- Bastien, J. I. L., K. A. McNeill and H. A. Fine (2015). "Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date." Cancer **121**(4): 502-516.
- Béliveau, R. and D. Gingras (2007). "Role of nutrition in preventing cancer." Canadian Family Physician **53**(11): 1905-1911.
- Burroughs, S. K., S. Kaluz, D. Wang, K. Wang, E. G. Van Meir and B. Wang (2013). "Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics." Future Med Chem **5**(5): 553-572.
- Cardoso, R., R. Love, C. L. Nilsson, S. Bergqvist, D. Nowlin, J. Yan, K. K. Liu, J. Zhu, P. Chen, Y. L. Deng, H. J. Dyson, M. J. Greig and A. Brooun (2012). "Identification of Cys255 in HIF-1alpha as a novel site for development of covalent inhibitors of HIF-1alpha/ARNT PasB domain protein-protein interaction." Protein Sci **21**(12): 1885-1896.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-257.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2011). "Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases." Nat Rev Drug Discov **10**(6): 417-427.

- Carreau, A., B. El Hafny-Rahbi, A. Matejuk, C. Grillon and C. Kieda (2011). "Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia." J Cell Mol Med **15**(6): 1239-1253.
- Claesson-Welsh, L. (2012). "Blood vessels as targets in tumor therapy." Ups J Med Sci **117**(2): 178-186.
- Clapp, C., S. Thebault, M. C. Jeziorski and G. Martínez De La Escalera (2009). "Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis." Physiological Reviews **89**(4): 1177-1215.
- Delehedde, M. (2013). Que sait-on du cancer?, EDP Sciences.
- Drewes, G. and T. Bouwmeester (2003). "Global approaches to protein-protein interactions." Current Opinion in Cell Biology **15**(2): 199-205.
- Dvorak, H. F. (2015). "Tumor Stroma, Tumor Blood Vessels, and Antiangiogenesis Therapy." Cancer J **21**(4): 237-243.
- Eales, K. L., K. E. R. Hollinshead and D. A. Tennant (2016). "Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells." Oncogenesis **5**(1): e190.
- Fauvelle, K. and J. P. Fauvelle (2012). Médicaments orphelins : rétrospective et perspective du marché européen: Marketing stratégique pharmaceutique, Jean-Philippe FAUVELLE.
- Flamme, I., T. Frohlich, M. von Reutern, A. Kappel, A. Damert and W. Risau (1997). "HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels." Mech Dev **63**(1): 51-60.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **285**(21): 1182-1186.
- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med **1**(1): 27-31.
- Folkman, J. (2004). "Endogenous angiogenesis inhibitors." APMIS **112**(7-8): 496-507.

- Folkman, J. (2006). "Angiogenesis." Annu Rev Med **57**: 1-18.
- Folkman, J. and Y. Shing (1992). "Angiogenesis." J Biol Chem **267**(16): 10931-10934.
- Fry, D. C. and L. T. Vassilev (2005). "Targeting protein-protein interactions for cancer therapy." J Mol Med (Berl) **83**(12): 955-963.
- Gabriel, J. A. (2007). The biology of cancer, John Wiley & Sons.
- Gloria, C., Q. Li, L. Xu and W. Zhang (2010). "Differentiation of diffusion coefficients to distinguish malignant and benign tumor." J Xray Sci Technol **18**(3): 235-249.
- Grimes, D. R., A. G. Fletcher and M. Partridge (2014). "Oxygen consumption dynamics in steady-state tumour models." R Soc Open Sci **1**(1): 140080.
- Gu, Y. Z., S. M. Moran, J. B. Hogenesch, L. Wartman and C. A. Bradfield (1998). "Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha." Gene Expr **7**(3): 205-213.
- Guo, Y., T. H. Scheuermann, C. L. Partch, D. R. Tomchick and K. H. Gardner (2015). "Coiled-coil coactivators play a structural role mediating interactions in hypoxia-inducible factor heterodimerization." J Biol Chem **290**(12): 7707-7721.
- Gupta, S. C., J. H. Kim, S. Prasad and B. B. Aggarwal (2010). "Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals." Cancer Metastasis Rev **29**(3): 405-434.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hellwig-Burgel, T., D. P. Stiehl, A. E. Wagner, E. Metzen and W. Jelkmann (2005). "Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions." J Interferon Cytokine Res **25**(6): 297-310.



- Hirota, K. and G. L. Semenza (2006). "Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1." Crit Rev Oncol Hematol **59**(1): 15-26.
- Holmgren, L., M. S. O'Reilly and J. Folkman (1995). "Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression." Nat Med **1**(2): 149-153.
- Jain, R. K. (2005). "Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy." Science **307**(5706): 58-62.
- Jason-Moller, L., M. Murphy and J. Bruno (2006). "Overview of Biacore systems and their applications." Curr Protoc Protein Sci **Chapter 19**: Unit 19 13.
- Jones, S. and J. M. Thornton (1996). "Principles of protein-protein interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 13-20.
- Jonsson, U., L. Fagerstam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Lofas, B. Persson, H. Roos, I. Ronnberg and et al. (1991). "Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology." Biotechniques **11**(5): 620-627.
- Ke, Q. and M. Costa (2006). "Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1)." Molecular Pharmacology **70**(5): 1469-1480.
- Keskin, O., A. Gursoy, B. Ma and R. Nussinov (2008). "Principles of protein-protein interactions: what are the preferred ways for proteins to interact?" Chem Rev **108**(4): 1225-1244.
- Key, J., T. H. Scheuermann, P. C. Anderson, V. Daggett and K. H. Gardner (2009). "Principles of ligand binding within a completely buried cavity in HIF2alpha PAS-B." J Am Chem Soc **131**(48): 17647-17654.
- Kola, I. and J. Landis (2004). "Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?" Nat Rev Drug Discov **3**(8): 711-715.
- Lamalice, L., F. Le Boeuf and J. Huot (2007). "Endothelial cell migration during angiogenesis." Circ Res **100**(6): 782-794.
- Leonard, P., S. Hearty and R. O'Kennedy (2011). "Measuring protein-protein interactions using Biacore." Methods Mol Biol **681**: 403-418.



- Liu, Y., T. Yin, Y. Feng, M. M. Cona, G. Huang, J. Liu, S. Song, Y. Jiang, Q. Xia, J. V. Swinnen, G. Bormans, U. Himmelreich, R. Oyen and Y. Ni (2015). "Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research." Quant Imaging Med Surg 5(5): 708-729.
- Lofstedt, T., E. Fredlund, L. Holmquist-Mengelbier, A. Pietras, M. Ovenberger, L. Poellinger and S. Pahlman (2007). "Hypoxia inducible factor-2alpha in cancer." Cell Cycle 6(8): 919-926.
- Loregian, A. and G. Palù (2005). "Disruption of protein-protein interactions: Towards new targets for chemotherapy." Journal of Cellular Physiology 204(3): 750-762.
- Maisonpierre, P. C., C. Suri, P. F. Jones, S. Bartunkova, S. J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T. H. Aldrich, N. Papadopoulos, T. J. Daly, S. Davis, T. N. Sato and G. D. Yancopoulos (1997). "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis." Science 277(5322): 55-60.
- Makino, Y., A. Kanopka, W. J. Wilson, H. Tanaka and L. Poellinger (2002). "Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus." J Biol Chem 277(36): 32405-32408.
- Masoud, G. N. and W. Li (2015). "HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy." Acta Pharm Sin B 5(5): 378-389.
- Maxwell, P. H., G. U. Dachs, J. M. Gleadle, L. G. Nicholls, A. L. Harris, I. J. Stratford, O. Hankinson, C. W. Pugh and P. J. Ratcliffe (1997). "Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth." Proc Natl Acad Sci U S A 94(15): 8104-8109.
- Maynard, M. A., A. J. Evans, T. Hosomi, S. Hara, M. A. Jewett and M. Ohh (2005). "Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma." FASEB J 19(11): 1396-1406.
- Meneses, A. M. and B. Wielockx (2016). "PHD2: from hypoxia regulation to disease progression." Hypoxia (Auckl) 4: 53-67.

- Mizejewski, G. J. (1999). "Role of integrins in cancer: survey of expression patterns." Proc Soc Exp Biol Med **222**(2): 124-138.
- Mohyeldin, A., T. Garzon-Muvdi and A. Quinones-Hinojosa (2010). "Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche." Cell Stem Cell **7**(2): 150-161.
- Muthukkaruppan, V. R., L. Kubai and R. Auerbach (1982). "Tumor-induced neovascularization in the mouse eye." J Natl Cancer Inst **69**(3): 699-708.
- Nelson, A. R., B. Fingleton, M. L. Rothenberg and L. M. Matrisian (2000). "Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications." J Clin Oncol **18**(5): 1135-1149.
- Nishida, N., H. Yano, T. Nishida, T. Kamura and M. Kojiro (2006). "Angiogenesis in Cancer." Vascular Health and Risk Management **2**(3): 213-219.
- OMS (2009). Rapport Sur La Sante Dans Le Monde: Les Soins De Sante Primaires, Organisation mondiale de la santé.
- Page, C. P. (1999). Pharmacologie intégrée, De Boeck Université.
- Parangi, S., M. O'Reilly, G. Christofori, L. Holmgren, J. Grosfeld, J. Folkman and D. Hanahan (1996). "Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 2002-2007.
- Pawson, T. and P. Nash (2003). "Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains." Science **300**(5618): 445-452.
- Pellegrini, M., D. Haynor and J. M. Johnson (2004). "Protein interaction networks." Expert Rev Proteomics **1**(2): 239-249.
- Pellicena, P. and J. Kuriyan (2006). "Protein-protein interactions in the allosteric regulation of protein kinases." Curr Opin Struct Biol **16**(6): 702-709.
- Petsko, G. A., D. Ringe, C. Sanlaville and D. Charnot (2008). Structure et fonction des protéines, De Boeck Supérieur.
- Ranjbar, B. and P. Gill (2009). "Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review." Chem Biol Drug Des **74**(2): 101-120.

- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-674.
- Rogers, J. L., L. Bayeh, T. H. Scheuermann, J. Longgood, J. Key, J. Naidoo, L. Melito, C. Shokri, D. E. Frantz, R. K. Bruick, K. H. Gardner, J. B. MacMillan and U. K. Tambar (2013). "Development of inhibitors of the PAS-B domain of the HIF-2alpha transcription factor." J Med Chem **56**(4): 1739-1747.
- Scheuermann, T. H., Q. Li, H. W. Ma, J. Key, L. Zhang, R. Chen, J. A. Garcia, J. Naidoo, J. Longgood, D. E. Frantz, U. K. Tambar, K. H. Gardner and R. K. Bruick (2013). "Allosteric inhibition of hypoxia inducible factor-2 with small molecules." Nat Chem Biol **9**(4): 271-276.
- Scheuermann, T. H., D. R. Tomchick, M. Machius, Y. Guo, R. K. Bruick and K. H. Gardner (2009). "Artificial ligand binding within the HIF2alpha PAS-B domain of the HIF2 transcription factor." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(2): 450-455.
- Scheuermann, T. H., J. Yang, L. Zhang, K. H. Gardner and R. K. Bruick (2007). "Hypoxia-Inducible Factors Per/ARNT/Sim Domains: Structure and Function." **435**: 1-24.
- Semenza, G. L. (2001). "HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing." Curr Opin Cell Biol **13**(2): 167-171.
- Semenza, G. L. (2012). "Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy." Trends in Pharmacological Sciences **33**(4): 207-214.
- Shchors, K., E. Shchors, F. Rostker, E. R. Lawlor, L. Brown-Swigart and G. I. Evan (2006). "The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1 $\beta$ ." Genes & Development **20**(18): 2527-2538.
- Smith, R. D., L. Hu, J. A. Falkner, M. L. Benson, J. P. Nerothin and H. A. Carlson (2006). "Exploring protein-ligand recognition with Binding MOAD." J Mol Graph Model **24**(6): 414-425.
- Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463-516.



- Suri, C., P. F. Jones, S. Patan, S. Bartunkova, P. C. Maisonpierre, S. Davis, T. N. Sato and G. D. Yancopoulos (1996). "Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis." Cell **87**(7): 1171-1180.
- Tian, H., R. E. Hammer, A. M. Matsumoto, D. W. Russell and S. L. McKnight (1998). "The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development." Genes & Development **12**(21): 3320-3324.
- Tournaire, R., M. P. Simon, F. le Noble, A. Eichmann, P. England and J. Pouyssegur (2004). "A short synthetic peptide inhibits signal transduction, migration and angiogenesis mediated by Tie2 receptor." EMBO Rep **5**(3): 262-267.
- Ullman, E. F., H. Kirakossian, S. Singh, Z. P. Wu, B. R. Irvin, J. S. Pease, A. C. Switchenko, J. D. Irvine, A. Dafforn, C. N. Skold and et al. (1994). "Luminescent oxygen channeling immunoassay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(12): 5426-5430.
- Voet, D., J. G. Voet and C. W. Pratt (2016). Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level, 5th Edition: Life at the Molecular Level, Wiley.
- Walsh, D. A. and C. I. Pearson (2001). "Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases." Arthritis Research **3**(3): 147-153.
- Wiesener, M. S., H. Turley, W. E. Allen, C. Willam, K. U. Eckardt, K. L. Talks, S. M. Wood, K. C. Gatter, A. L. Harris, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe and P. H. Maxwell (1998). "Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha." Blood **92**(7): 2260-2268.
- Wu, D., N. Potluri, J. Lu, Y. Kim and F. Rastinejad (2015). "Structural integration in hypoxia-inducible factors." Nature **524**(7565): 303-308.
- Xia, Y., H.-K. Choi and K. Lee (2012). "Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors." European Journal of Medicinal Chemistry **49**: 24-40.
- Zhang, P., Q. Yao, L. Lu, Y. Li, P.-J. Chen and C. Duan (2014). "Hypoxia-Inducible Factor 3 Is an Oxygen-Dependent Transcription Activator and Regulates a Distinct Transcriptional Response to Hypoxia." Cell Reports **6**(6): 1110-1121.

Zhu, J., M. Martinez-Yamout, R. Cardoso, J. Yan, R. A. Love, N. Grodsky, A. Brooun and H. J. Dyson (2012). "Homodimerization of the PAS-B domains of hypoxia-inducible factors." J Phys Chem B **116**(23): 6960-6965.